嫌気微生物群集による

ポリ塩化ビフェニル分解活性の獲得と特性評価

Development and characterization of anaerobic consortia degrading polychlorinated biphenyls

馬場 大輔

目次

第 1 章　緒言

1.1　はじめに

今日、人工的に合成された化学物質は世界中で増加し続けており、天然物由来化学物質を含めた商業製品で約 10 万種､研究段階の合成物質を含めると約 100 万種存在するといわれている(環境省, 2006)。これらの化学物質は、社会に利潤を生む一方、地球環境に生息する生物や生態系に対して悪影響を及ぼす可能性がある。

使用後の化学物質は、それらが確実に回収し再利用される場合を除けば、焼却処理や廃棄物処分場に埋められて環境中に戻されるほか、製造や使用の過程で、大気、水圏、土壌などの環境媒体へ拡散する。その結果として、複数の化学物質による複合的で広範囲におよぶ環境汚染が生じている。特に土壌や地下水汚染は、媒体の動きが遅いため汚染物質が蓄積しやすく、長期間にわたってリスクを及ぼし続ける。また、長期残留型の土壌汚染は、大気や水圏への汚染にも強い関連性を示すこともわかってきた(環境省, 2006)。環境汚染物質として問題視されているのは、ダイオキシン類、石油系炭化水素類、農薬類、重金属類などである。ヘキサクロロベンゼンやディルドリン、DDT(Dichloro diphenyl trichloro ethane)や PCB(Polychlorinated biphenyl)、ダイオキシン類などの 12 種の物質は、特にその毒性が問題視されるため、POPs 条約(残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約、2001 年 5 月)の対象物質となっている。ダイオキシン類とは、一般にポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (Polychlroinated dibenzo-p-dioxin; PCDD) とポリ塩化ジベンゾフラン(Polychlorinated dibenzofuran; PCDF)をまとめてダイオキシン類と呼び、コプラナーPCB のようなダイオキシン類と同様の毒性を示す物質をダイオキシン類似化合物と呼んでいる(Fig. 1-1)。これらの化学物質は、通称 POPs(残留性有機汚染物質：Persistent Organic Pollutants)と呼ばれており、これらの物質は、自然界において分解酵素系が存在しないこと、分解菌にとって基質利用が有効な状態にないこと、または、分解菌の活性がないなどの理由の結果、難分解性物質として扱われる(片山ら, 2000)。POPs 類は、その環境残留性によって環境中を広範囲に汚染しているため、生物蓄積しやすく、人体にも有害な影響を及ぼすことが懸念されている。平成 10 年以降、土壌汚染発覚件数は、毎年 200 件を越しており、近年多くの公共団体や企業などが積極的にその汚染処理策を講じている(環境省, 2006)。また 2003 年 2 月には「土壌汚染対策法」が施行されるなど法整備も整ってきており、土壌汚染対策に関する技術開発・研究が急務とされている。
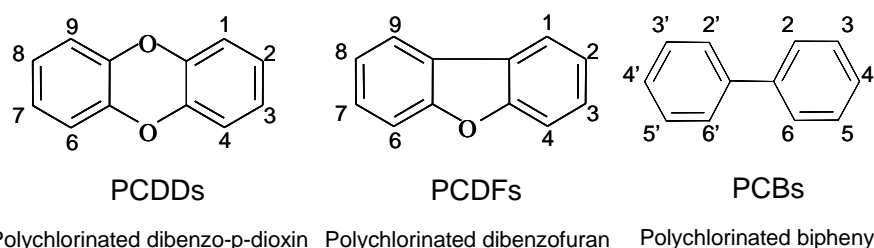
Fig. 1-1 Chemical structure of polychlorinated dioxins (PCDDs, PCDFs), and PCBs

1.2　土壌汚染とその対策技術

有害化学物質による土壌汚染修復技術は、汚染土壌焼却法、土壌洗浄法、土壌抽出法などの物理・化学的処理方法を中心に行われており、汚染物質に応じて、その施行方法なども日々改良されている。これらの技術は、短期間で高濃度有害汚染物質を処理する方法として有効であり、多くの汚染箇所に対して広く用いられている。しかし、その処理コストは非常に高い上に環境負荷も大きく、安全性への不安から施設建設等に対する一般住民の理解を得るにも、多くの時間を要する。

近年、一般市民から安全性や経済性に対する理解が得やすく、かつ永続的で低コストに汚染を浄化できる技術として、バイオレメディエーション(Bioremediation)という方法が注目を集めている。バイオレメディエーションは、著しい高濃度汚染には不向きであること、分解菌の活性が保障されないことや、微生物の病原性を含む安全性の検証が不十分であることなどが課題として挙げられるが、自然界に存在する微生物の生物活性を利用して、その汚染環境を浄化する技術の総称である。このバイオレメディエーションには、究極の低コスト浄化技術として最近注目されているナチュラルアテニュエーション(科学的自然減衰：Monitored Natural Attenuation)も含まれる。ナチュラルアテニュエーションは、汚染土壌に対して積極的な浄化対策を施すのではなく自然の浄化能力に最大限依存したもので、定期的なモニタリングを行うことで、汚染の低毒化と拡散状態のみを監視し管理する技術のことである。しかし実際の汚染浄化技術は、何らかの積極的な技術処理を施すことで、その生物浄化能力を最大限に高めより短期間で処理できるように、高効率化が期待されている。

積極的なバイオレメディエーション技術には、その方法を大別して *in situ* と *ex situ* の 2 つの方法がある。*In situ* バイオレメディエーションは、汚染土壌や地下水を現位置で修復する技術のことで、汚染物質の拡散も少なく、一度に大量の土壌処理が可能である。一方、*ex situ* バイオレメディエーションは、汚染土壌等を隔離し浄化処理を行う方法で、処理期間も比較的短時間で、多様な汚染物質や土壌種に適用可能である。バイオレメディエーションに適応されている具体的な手法は、ランドファーミング、ベッドリアクター、バイオベンティング、コンポスティング、バイオフィルターなどである(大森ら, 2000)。また、バイオレメディエーションにおける微生物の利用方法にも 2 種類ある。ひとつは、対象汚染物質に対する分解微生物菌が汚染現場に存在しない場合に、既に分解能などが確認された分解微生物を外部から接種するバイオオーギュメンテーション(Bioaugumentation)である。もう一方は、土着の微生物の分解活性をあげるために、現場の土壌条件に適切な処理を施して分解を促進するバイオスティミュレーション(Biostimulation)である。これらの手法や微生物利用方法を組み合わせることで、様々なバイオレメディエーション技術が開発されている。また、物理・化学的処理を行った後の微量汚染物質が残留している現場に対して、バイオレメディエーション技術を組み合わせる例もある。例えば、金属鉄を用いた有機塩素化合物の化学的処理と微生物分解を組み合わせた事例がある(MERL Team, 2002)。これは、ハロゲン化アルキルと金属イオンとの反応にヒントを得た有機化学的脱塩素化反応と、その脱塩素化産物に対する微生物資化

反応を組み合わせたもので、微生物にとって比較的困難な完全脱塩素化反応と化学的分解が難しい炭化水素分解を組み合わせた技術である。ただし、これらは、二段階反応であるために、その切換えにおける不完全な面が課題として残っている。そこで近年、*in situ* バイオレメディエーションのうち、地下地盤・底質等の嫌気的環境において拡散してくる有害化学物質を、現位置で分解するバリヤー型のバイオレメディエーション技術が有力視されている(Fig. 1-2)。これは、分解微生物を包埋した微生物資材もしくは集積させるための担持体が充填された微生物バリヤーを汚染現場に埋設し、地下水流などによって拡散する汚染物質を捕捉すると同時に、汚染物質の低毒・無害化処理を行う技術である。バリヤー型バイオレメディエーション技術は、必要最小限の作業で生態系への拡散を防げることから、特に期待されている技術である。

我が国におけるバイオレメディエーション技術の実施例は、主にガソリンや原油などの油汚染対策、有機塩素化合物(TCE や PCE)などを対象としたバイオスティミュレーションが主体となっている(環境省, 2005)。バイオレメディエーション技術の市場規模は、近年の土壌・地下水汚染への関心の高まりや、ISO14000s の取得、土地の時価評価などを考えると、今後これ以上のスピードで成長する可能性をもっている。特に、有機塩素系化合物の浄化市場に限っても、全体で 1 兆数千億円規模と考えられており、バイオレメディエーション技術はそのうちの約 2 割(2000 億円ほど)を占めると言われ、ゼネコンやプラントメーカーが大きな関心を寄せている(環境省，2005)。これらの状況を受け、環境省と経済産業省は、2005 年 3 月 30 日付けで「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」を告示した。指針では、①浄化事業の実施にあたって、事業者が事前に「浄化事業計画」や「生態系への影響評価書をまとめること、②生態系への影響評価を踏まえた浄化事業計画に従って浄化事業を実施すること、③経済産業大臣・環境大臣は、事業者の要請に応じ浄化事業計画が利用指針に適合しているか確認することを規定している(環境省, 2005)。
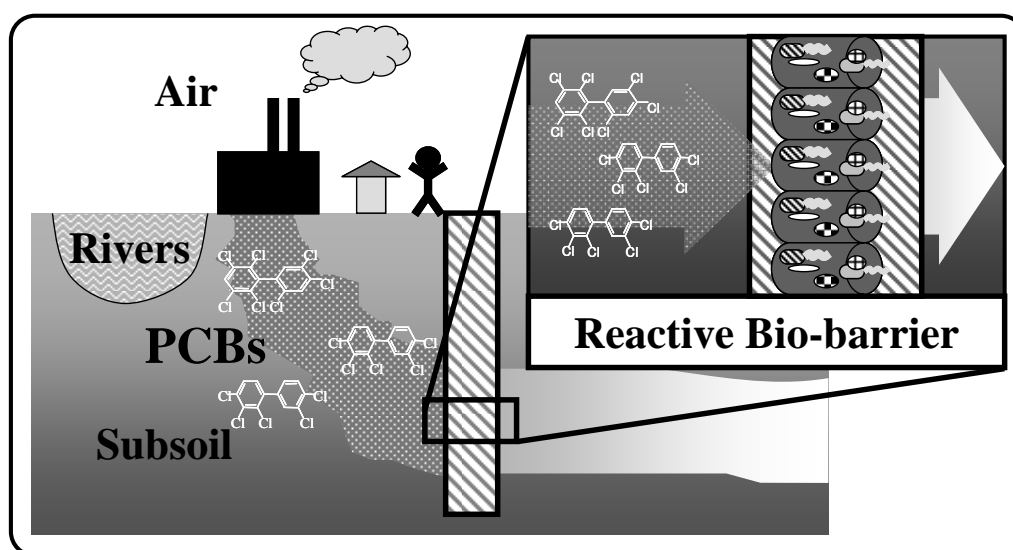
Fig. 1-2 Conceptual illustration of the PCB decontaminating reactive bio-barrier

1.3　ポリ塩化ビフェニル **Polychlorinated biphenyl (PCB)**

1.3.1 PCB の性質

PCB は、ベンゼン環が 2 つつながったビフェニル骨格を持ち、その任意の水素が 1～10 個の塩素で置換された基本構造を持つ有機塩素化合物の総称である(Fig. 1-1)。PCB は、その置換塩素数と塩素付加位置によって理論上 209 種類の異性体(同族体)が存在し、実際の市販品も 100 種を越える PCB 同族体の含有が確認されている。PCB の性質は、各同族体の塩素置換数に応じて異なっている。市販品の PCB は、無色の液状のものから、黄色から黒色の粘性の高い油状のものがある。PCB は、一般に不燃性で低揮発性、加熱・冷却による性質変化が見られず、酸・アルカリにも強く、化学的に安定で風化に対する耐性が大きい。また、絶縁性があり電気的特性に優れており、水に不溶で有機溶媒に易溶、粘着性、伸展性にも優れるなど多くの特徴を有している。

一方で PCB の毒性は、一日許容摂取量(ADI：Acceptable daily intake)は 0.005 mg/Kg/day であり、その急性致死量は 10～20 g/体重 50 kg といわれている。また、最小発症量は 0.5 g/体重 50 kg で、確実発症量は 2 g/体重 50 kg といわれている(環境省, 2005)。LogKow(オクタノール/水分配係数)は、4.3～8.26 で、実験的に求められる生物濃縮係数(BCF：Bio-concentration factor)は、120,000～270,000 である(環境省, 2004)。特に、4,4'位に塩素を付加した構造をもつ同族体をコプラナーPCB (Table 1-1)と総称しているが、これらはダイオキシン類に分類され、その耐容一日摂取量(TDI : Tolerable daily intake)も 4 pg-TEQ/kg/day となり、毒性が高くなる。PCB は、体内において皮膚、肺や胃腸から吸収され、肝臓や筋肉をはじめとする脂肪組織に蓄積される。高濃度 PCB に暴露されると、皮膚炎や肝機能障害、神経系異常も引き起こす。また現在では、女性ホルモンであるエストロゲン様作用をもつ外因性内分泌かく乱物質、いわゆる環境ホルモンとしても問題視されており、鳥類や哺乳類の生殖作用に影響することが懸念されている(環境省, 2005)。

1.3.2 PCB の歴史

1881 年にドイツで初めて PCB が合成された当時、その優れた化学的性質から「夢の化学物質」として様々な用途で重宝された。日本における市販品の PCB は、鐘淵化学工業(1954 年, 現株式会社カネカ)が「カネクロール(Kanechlor；以下 KC と略記)」の商品名で KC-300、KC-400 といった製品(Fig. 1-3)を、三菱モンサント(1969 年, 現株式会社三菱ケミカルホールディングスグループ)が「アロクロール(Aroclor)」の商品名で Aroclor1242、Aroclor1254 といった製品の生産を開始した(Table 1-2)。海外では、モンサント社製の Aroclor が広く用いられた。

PCB 使用量の 7 割は、トランス・コンデンサなど火災の危険性の高い電気設備に使用される絶縁油として重宝され、その他、各種化学工業や食品の加熱・冷却行程の熱媒体や、電線や樹脂などの可塑剤、塗料やノーカーボン紙の溶剤や、農薬の効力延長材など幅広い用途で

Table1-1 Toxic equivalency factors for dioxins for human risk assessment

	congeners	congener#	TEF
PCDDs	2,3,7,8-TCDD		1
	1,2,3,7,8-PeCDD		1
	1,2,3,4,7,8-HxCDD		0.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDD		0.1
	1,2,3,7,8,9-HxCDD		0.1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD		0.01
	OCDD		0.0003
PCDFs	2,3,7,8-TCDF		0.1
	1,2,3,7,8-PeCDF		0.03
	2,3,4,7,8-PeCDF		0.3
	1,2,3,4,7,8-HxCDF		0.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDF		0.1
	1,2,3,7,8,9-HxCDF		0.1
	2,3,4,6,7,8-HxCDF		0.1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		0.01
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF		0.01
	OCDF		0.0003
PCBs	3,4,4’,5-TCB	#81	0.0003
(coplanar-PCBs)	3,3',4,4'-TCB	#77	0.0001
	3,3',4,4',5-PeCB	#126	0.1
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	0.03
	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	0.0003
	2,3,4,4',5-PeCB	#114	0.0003
	2,3',4,4',5-PeCB	#118	0.0003
	2',3,4,4',5-PeCB	#123	0.0003
	2,3,3',4,4',5-HxCB	#156	0.0003
	2,3,3',4,4'5'-HxCB	#157	0.0003
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	0.0003
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	0.0003

TEF were redefined by WHO (2006)
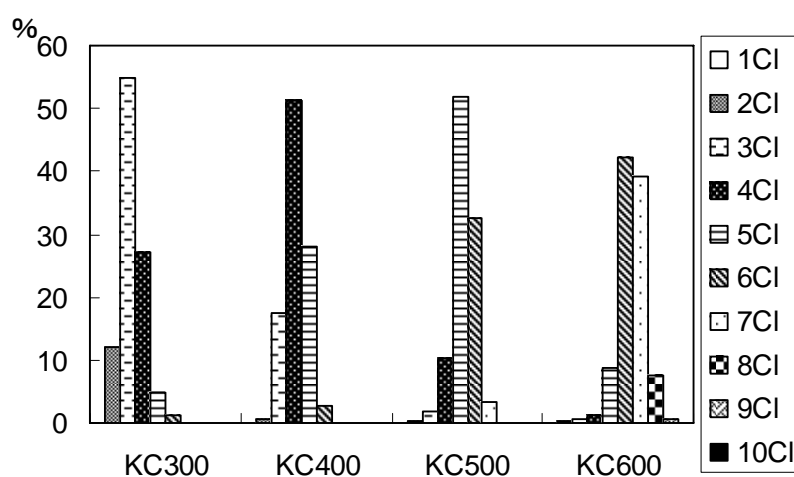
Fig.1-3 PCB congener pattern percentage in each KC (Kanechlor) series

用いられていた。世界中では、120 万 t の PCB が生産されており、日本についてみてみると 1954 年から 1972 年の間に 58,787 t の PCB が生産され、1,158 t の PCB が輸入された。この間 54,001 t が使用された(環境省, 2005)。

ところが、1968 年に発症した「カネミ油症事件」では、当初その原因が PCB と考えられたため、この事件をきっかけに、人体に対する影響が指摘されるようになった。その後になって、この事件の主原因が、当時未研究であった PCDF や PCDD などの複合汚染であることが判明した。しかし、環境調査が進むにつれ、東京湾などの海水や底泥における PCB 汚染が判明したほか、母乳からも 80 pg-TEQ/g-fat のダイオキシン類が検出されるなど、広範な PCB 汚染の実態が明らかとなってきた(環境省, 2005)。このため、1972 年には PCB の製造が中止されるとともに、PCB を使用していた製品を回収するなどの緊急措置が取られた。また、1973 年には、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化学物質審査規制法)」が制定され、PCB を特定化学物質として指定し、原則として製造や輸入を禁止する厳しい措置が取られた。さらに、PCB による環境汚染を防止するために、公害対策基本法に基づいて環境基準や排出基準等が定められた(Table 1-3)。

Table 1-2 Correspondences of the commercial PCB mixture

	Kanechlor	Aroclor
Dichlorinated biphenyls	KC-200	Aroclor-1232
Trichlorinated biphenyls	KC-300	Aroclor-1242
Tetrachlorinated biphenyls	KC-400	Aroclor-1248
Pentachlorinated biphenyls	KC-500	Aroclor-1254
Hexachlorinated biphenyls	KC-600	Aroclor-1260

Table 1-3 Environmental standards for PCBs in Japan

Environments	Environmental standard
Foods (fishes)	≦3 ppm
Soils	ND
Waste waters	≦30 μg/l
Drinking water and ground water	ND
Sediments	≦10 ppm
Atmosphere	≦0.5 μg/m^3
Exausted gas	≦0.15 mg/m^3

Abbreviations, ND: not detected; 0.01pg/L for waters, 0.01μg/kg for sediments.

出典：環境省平成 14 年度 POPs モニタリング調査結果(2005)

1.3.3 PCB の処理技術

アメリカ合衆国やドイツなど、PCB を大量使用してきた先進諸国では、PCB 処理が既に完了もしくは現在実行中など、近い将来の廃絶までの道筋が明示されている。我が国では、まだ全廃への道筋は明示されていないが、PCB 処理を進展させるべく「廃棄物の処理及び清掃に関する法律(廃掃法)」が何度も改定施行されており、2001 年には「PCB 廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法(PCB 特別措置法)」が施行され、法的側面からも整備が進み始めた。PCB 特別措置法の主な内容は、①PCB 廃物を保管する事業者に一定期間内(2016 年 7 月 15 日まで)に処分することを義務付け、②PCB 廃棄物保管事業者等に保管状況等の毎年度の届け出を義務化、③国は PCB 廃棄物処理基本計画を策定、都道府県は国の基本計画に則して PCB 廃棄物処理計画を策定、④PCB 製造者等は、国及び地方公共団体が実施する施策に協力(PCB 廃棄物処理基金への出えん等)となっている。

既に隔離・管理された PCB および PCB 含有廃棄物の処理は、脱塩素化分解法を中心とした公定された物理･化学的処理方法を適応することが最も安全かつ確実である。近年、廃 PCB の処理技術は、電力会社や大手建設会社らが中心となって、物理・化学的処理方法を中心に様々な方法が開発しており、PCB 特別措置法に基づいて財団法人産業廃棄物処理事業振興財団により廃棄物処理法として次々と認可されている(Table 1-4)。現在、国の監督のもと JESCO(Japan environmental safety corporation)が、第一号の北九州事業をはじめ、豊田事業、東京事業、大阪事業、北海道事業の全国 5 箇所に PCB 廃棄物処理施設を設置し、保管事業者らの委託を受けて処理を行っている。各処理施設の事業内容を Table 1-5 にまとめた(JESCO, 2006)。また民間企業等の自社処理施設も 20 箇所以上存在する(閉鎖済み･建設計画中も含む)。

Table 1-4 The methods for decomposition of PCBs

原理		方式系	処理技術の概要
焼却		燃焼	1100℃以上の恒温で燃焼･分解
脱塩素化	アルカリ分解法	アルカリ触媒分解法 化学抽出分解法 有機アルカリ金属分解法	アルカリ試薬、水素供与体、触媒等の存在下で PCB 分解
	水素化分解	触媒水素化脱塩素法	触媒を用い、水素と PCB 中の塩素を結合させることにより脱塩素化
	金属ナトリウム分解	金属ナトリウム分解法	金属ナトリウムと加熱することにより脱塩素
	光分解	UV 触媒分解法	紫外線で低塩素化した後、触媒で分解
水熱酸化分解		水熱酸化分解法･超臨界水酸化分解法	超臨界水を利用した酸化分解

出典：PCB 処理技術ガイドブック(1999)

Table 1-5 Five plants of JESCO and their disposal capacity

Places	Initiation date	Disposal capacity
Kitakyusyu	Dec. 2004	0.5 t/day
Toyota	Sep. 2005	1.6 t/day
Tokyo	Nov. 2005	2 t/day
Osaka	Aug. 2006	2 t/day
Hokkaido	Oct. 2007	1.8 t/day

1.3.4 PCB の汚染状況

近年、法整備を分析精度の向上により、ダイオキシン類による環境汚染が次々と顕在化するようになり、1999 年 7 月にはダイオキシン類対策特別措置法が公布され、複数の環境媒体に渡り包括的な対策がとられるようになった。ダイオキシン類は、毒性の強さがそれぞれ異なっており、2,3,7,8-TCDD が最も強い毒性を持つことが知られている(WHO, 2006)。毒性等価係数(TEF：Toxic Equivalency Factor)は、この 2,3,7,8-TCDD の毒性を 1 として、他のダイオキシン類の毒性を算出されている。ダイオキシン類の毒性は、この TEF を用いて換算した毒性等量(TEQ：Toxic Equivalent)が用いられている(Table 1-1)。ダイオキシン類は、分析のための標準品の作成などの研究目的で合成される以外は、意図的に作られることは無く、C、O、H、Cl を含む物質が熱せられるような過程で自然にできてしまう副生成物である。しかし、日本国内で発生するダイオキシン類の 60%がコプラナーPCB であるため、環境中を広範囲に渡って汚染している PCB が、その発生源であることが懸念されている(環境省, 2005)。コプラナーPCB は、5 塩素、6 塩素置換されたものが多く、環境中から検出される PCB 構成比でみても、3 塩素、4 塩素、5 塩素置換された PCB が多いことがわかっている(Table 1-6)。

Table 1-6 The PCB concentration for individual chlorinated congeners in the environments in 2002

Chlorinated congeners	Concentration in environments	
	Waters	Sediments
Monochlorinated biphenyls	ND-0.06 pg/l	ND-0.31 μg/kg
Dichlorinated biphenyls	ND-9.1 pg/l	0.02-16 μg/kg
Trichlorinated biphenyls	0.02-7.5 pg/l	0.11-110 μg/kg
Tetrachlorinated biphenyls	0.02-25 pg/l	0.26-130 μg/kg
Pentachlorinated biphenyls	ND-9.6 pg/l	0.37-93 μg/kg
Hexachlorinated biphenyls	ND-0.27 pg/l	0.26-55 μg/kg
Heptachlorinated biphenyls	ND-0.03 pg/l	0.06-50 μg/kg
Octachlorinated biphenyls	ND	ND-14 μg/kg
Nonachlorinated biphenyls	ND-0.02 pg/l	ND-0.63 μg/kg
Total PCBs	ND-45 pg/l	1.2-430 μg/kg

Abbreviations, ND: not detected; 0.01pg/l for waters, 0.01μg/kg for sediments.

出典：環境省平成 14 年度 POPs モニタリング調査結果 (2005)

我が国のダイオキシン類の年間排出量は341〜363 g-TEQであると推測されている(環境省, 2005)。環境中での平均的なダイオキシン濃度は、大気中で 0.059 pg-TEQ/m^3、公共用水域の水質で 0.33 pg-TEQ/L、底質では 7.5 pg-TEQ/g、地下水質では 0.063 pg-TEQ/L、土壌では 3.1pg-TEQ/g であるが、いずれも環境基準値よりも低い値であった(環境省, 2005)。PCB に関してみてみると、その化学的安定性により自然界での分解が困難で、日本中の環境中から現在に至るも微量な PCB が検出されている(Table 1-7)。PCB の環境中における半減期は、10 日〜1.5 年と報告されているが、嫌気的な土壌や底質や河川堆積物中では、数年〜38 年近くの数値も報告されている(環境省, 2005)。具体的ないくつかの同族体の半減期に関する報告からは、3 塩素化、4 塩素化 PCB で約 10 年、5 塩素化、6 塩素化 PCB で約 9 年と報告されている(Sinkkonen and Paasivirta, 2000)。 コプラナーPCB を含むダイオキシン類の半減期は、さらに長く、土壌中では 63 年とされている(環境省, 2005)。

Table 1-7 PCB concentration in the environments

Environments	Concentration
Waters	60-11000 pg/l
Sediments	39-630000 pg/dry-g
Soils	≦825 μg/dry-kg
Atmosphere	16-880 pg/m^3
Pisces	1500-550000 pg/wet-g
Shellfishery	200-160000 pg/wet-g
Birds	4800-22000 pg/wet-g
Mammalians	0.11-30000 μg/dry-kg

出典：環境省平成 14 年度 POPs モニタリング調査結果(2005)

このように日本のみならず地球全体に環境拡散した PCB は、初期濃度が低濃度であったとしても、土壌などから河川や河口に溶出しプランクトン等の体内に取り込まれ、これらを摂取する小魚⇒大型魚⇒動物類といった食物連鎖による生物濃縮(ex. スルメイカで 24 万倍濃縮)を経て、高濃度となった PCB がヒトへ摂取される。そのため、ヒトへの汚染経路は、直接的な暴露よりもむしろ、PCB の環境拡散による間接的な暴露が主に心配されている。

その一方で、メーカーによる PCB 及び PCB 含有廃棄物は約 7000 t しか回収されていない。水質・土壌における PCB の環境基準は、「PCB が検出されないこと」となっており、また底質の暫定除去基準は、10 ppm となっている(Table 1-3)。PCB を高濃度含む製品や、高濃度 PCB を含む汚染土壌などは、PCB 対策特別措置法案では対象とされていないが、上記 PCB 処理施設で処理されるまでは、管理区で半永久的に厳重管理するという対策がとられている。しかしながら、厳重に保管している場合でも、PCB の揮発や、火災や地震等による環境拡散のリスクも十分考えられる。また、その管理体制も長いものでは既に 30 年近い年月が経過していることから、長期化する保管期間や、施設の老朽化、容器の腐食によって、PCB の遺漏が懸

念されている。さらに、PCB 製造工場や PCB 製品製造工場の周辺土壌や排水口の底質などの汚染の可能性は十分に高い。実際に鐘淵化学工業高砂事業所と三菱製紙高砂工場の排水口付近の PCB 汚染底質は、現在も未処理のまま保管され続けている。このほかにも、PCB 使用工場から垂れ流された PCB による河川の底質への堆積問題や、PCB 不法投棄による汚染土壌問題などが顕在化している。各種施設に現在も散在している未回収の PCB の一部は、行方不明になるなど環境中への不法な漏出も問題となっている(環境省, 2005)。

しかしながら、市街地土壌や農用地土壌、さらに操業中のみならず、廃業・解体された工場地土壌などを中心に、低濃度で広範囲な PCB 汚染が発覚する可能性も高い。低濃度広範囲汚染は、緊急の危険性は低いものの、物質循環や生物濃縮による健康被害を考えると、その無害化処理技術の確立が必要とされる。一方で、環境基準値未満の低濃度広範囲の土壌地下水汚染あるいは底質汚染に対して、多額のコストを投資することは難しい。また、生活圏に近い場所で汚染が発覚した場合、大規模な物理・化学的処理方法を施工することも難しい。低コストで環境負荷の少ない適当な処理技術は、未だ開発されていないのが現状である。

一般に、PCB は親油性物質であり、その性質を最大限利用するために絶縁油などの油に溶かして使用されることが多かった。油に溶けた PCB が環境中に遺漏すると、雨水等による溶脱や流亡が起こりやすく、自身の揮発などによる飛散も含めて広範囲に拡散する。拡散した PCB の一部は、その過程で好気的に微生物分解されることもある。しかし、土壌や底質に吸着されやすい性質があるため、最終的には、環境中でも特に下層土壌や河川・沿岸部の底質などで汚染が発覚する場合が多い。これらの汚染環境は、溶存酸素濃度が極めて低い嫌気的な環境となっている場合が多い。また、深層であるために、掘削や移動により発生するコストが高いだけでなく、その作業の際に新たな汚染拡大を引き起こしかねない。環境負荷や費用効果の面からも、現位置における嫌気的汚染処理技術の開発が求められている。そこで、PCB の拡散を防ぐバリヤー型現位置バイオレメディエーション技術の開発に注目した(Fig. 1-2)。

1. 4 PCB の微生物分解

微生物は、PCB のような有機汚染物質に対して、分解酵素を生産することでその有害性を低減する能力を持つと考えられている。微生物分解には、無機化と共代謝がある。無機化反応は、分解能を有する微生物が、有機汚染物質を炭素源やエネルギー源として利用する反応である。一方、共代謝反応は、有機汚染物質を別の物質に変えるために、炭素源やエネルギー源となる別の基質を必要とする反応である。この場合、代謝物質に関して、自身もしくは他の微生物による更なる分解が期待され、複雑な生態系が必要となる。

PCB は、難分解性物質であるが、環境中で分解されることが知られている(Ahmed and Focht, 1973)。PCB の微生物分解は、①好気的酸化分解と②嫌気的還元的脱塩素の２つの反応が知られている。

1.4.1 好気的条件下における PCB の酸化分解

好気的酸化分解反応は、主に塩素元素による立体障害の少ない低塩素化 PCB に対する反応が知られている。これは、有機塩素化合物そのものを炭素源として利用する場合と、酸素など他の電子受容体存在下で酸化基質として利用する場合がある。低塩素化 PCB 及びビフェニルは、ビフェニルジオキシゲナーゼによる芳香族の酸化的開裂反応が起こって、単環塩素化合物(クロロベンゼン)へと変換された後、さらにカテコール誘導体を経て、二酸化炭素と水にまで完全に無機化される(Fig. 1-4)。分解微生物としては、*Pseudomonas* 属、*Alcalegenes* 属、*Nocardia* 属、*Acinetobacter* 属などの細菌が既に単離されており、またこれらの反応に関与する酵素・遺伝子解析も決定されている(Table 1-8)。しかし、現在 PCB 残留例の多い嫌気環境下においては、好気性微生物の活性を利用することは難しく、嫌気性微生物の利用が期待されている(Wiegel and Wu, 2000)。また、高塩素化 PCB の好気的分解は、現段階では知られていないため、環境中から検出される多種多様な PCB 複合汚染の浄化に利用することは難しい。
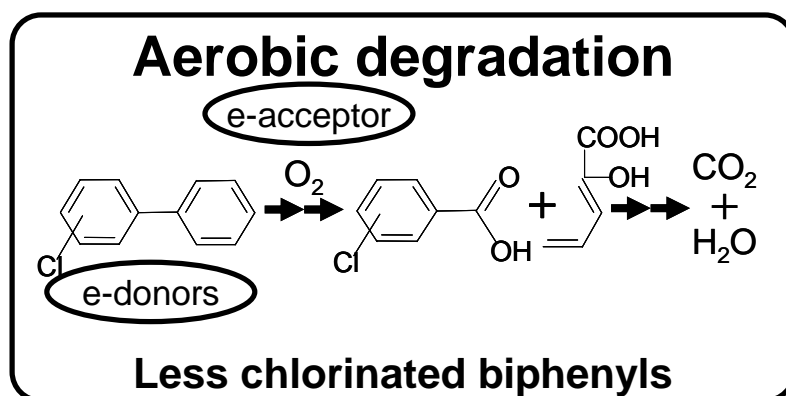
Fig. 1-4 Aerobic degradation of less chlorinated biphenyls

1.4.2 嫌気的条件下における脱塩素活性

嫌気的還元的脱塩素化反応は、共代謝による脱塩素化と、有機塩素化合物を電子受容体として利用する脱ハロゲン呼吸(Halorespiration)と呼ばれる脱塩素化がある。脱ハロゲン呼吸では、PCB などの有機塩素化合物を電子受容体として還元利用することでエネルギー獲得しており、電子供与体となる基質の酸化により生成された電子が、微生物生体内の ATP 生成過程である電子伝達系において、有機塩素化合物の炭化水素骨格に結合している塩素を攻撃し、その結果塩素が脱離するものと考えられている(Fig. 1-5)。有機塩素化合物の脱塩素化微生物は、3-クロロ安息香酸をはじめとする塩素化合物を脱塩素化する *Desulfomonile tiedjei* (Mohn and Tiedje, 1990, 1991)や、塩素化フェノール類を脱塩素化する *Desulfitobacterium dehalogenans* (van de Pas et al., 1998)、*D. chlororespirans* (Löffer et al, 1996)などが報告されている。このほか、PCE(Tetrachloroethene)の脱塩素化菌として、*Dehalobacter restrictus* (Holliger et al, 1998)や *D. multivorans*(Scholz-Muramatsu et al., 1995)が知られていたが、近年エチレンにまで完全脱塩素する嫌気性脱塩素菌 *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 の単離成功(Maymo-Gatell, 1997)が報告されて注目を集めた。この他、*Clostridium* 属や *Methanococcous* 属、*Methanosarcina* 属な

Table 1-8 Aerobic PCB degrading bacteria

Isolates	metabolites	Reference
Achromobacter	BP, 4-CBP	Ahmed and Focht, 1972
Nocardia sp. *Pseudomonas* sp.	PCB	Baxter et al, 1975
Alcalegenes odorans, A. denitrificans	Aroclor1242	Clark et al, 1979
Acinetobacter strain P6	Aroclor1254 with BP	Focht and Brunner, 1985
Acinetobacter strain P6, *Arthrobacter* strain B1B	BP, 4-CBP, Aroclor1254 with BP	Furukawa et al, 1978
Alcalegenes H850	BP, monoCBP, Aroclor1242,1248,1254	Cookson, 1995
Janibacter MS3-02	Aroclor1242	Sierra et al, 2003
Alcalegenes eutrophus H850	2,3-, 5,6-position CBP	Bedard et al, 1983
Pseudomonas putida LB400	2,3,4,4',5'-CBP	Bedard et al, 1990, 1987
Alcalegenes eutrophus, Pseudomonas putida, Corynebacterium sp.	2,3,3’,4’-CBP	Unterman et al, 1988
Pseudomonas sp.2	2,4,4'-, 2.2'.5-, 2,2',5,5'-, 2,2',4,5'-, 2,2',5,5'-CBP with BP	Komancova et al, 2003
Pseudomonas testrosterone B356	PCB	Albro and McKinney, 1981
Acinetobacter sp.	KC-200, 300, 400	Furukawa et al, 1983
Achromobacter sp., *Bacillus brevis*	PCB	Pettigrew et al, 1990
Alcaligenes sp. JB1	di-CBP, hexa-CBP	Camandeur et al, 1996
Pseudomonas aeroginosa, Pseudomonas putida	PCBs	Kohler et al, 1988

Abbreviations, BP: biphenyl, CBP: chlorinated biphenyl

‘with’ indicated co-metabolisms for degradation.

どによる塩素化アルキル化合物の脱塩素化も報告されている(Mohn and Tiedje, 1992)。また、これらの脱塩素化菌から分子育種によりデハロゲナーゼ(脱塩素化酵素)の解明も進んでいる。*Dehalospirillium multivorans* からとられた PCE デハロゲナーゼ(Neumann, et al., 1998)、*Desulfitbacterium dehalogenans* からとられた *ortho*-クロロフェノールデハロゲナーゼ(Van de Pas et al., 1999)、そして *Dehalococcoides ethenogenes* からとられた TCE デハロゲナーゼ(Magnuson et al., 2000)の研究に始まり、特に *Dehalococcoides* 属と *Desulfitibacterium* 属の脱塩素化酵素群は、その機能解析が進行している(Nonaka et al., 2006)。
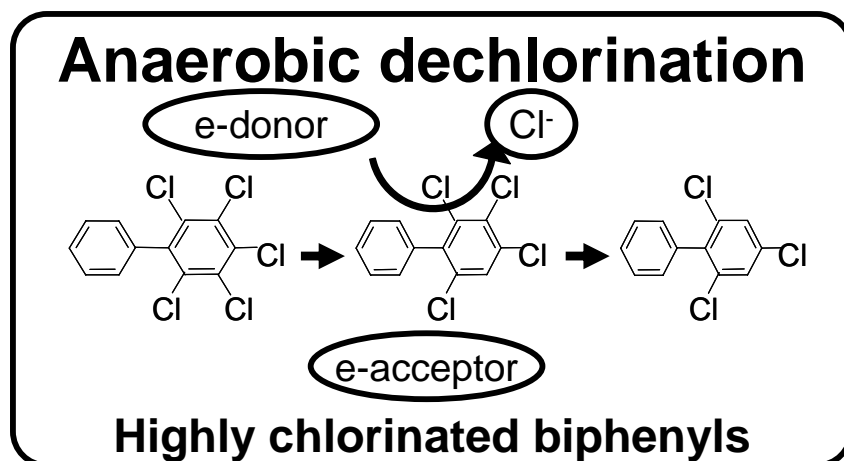
Fig. 1-5 Anaerobic dechlorination of highly chlorinated biphenyls

1.4.3 PCB の嫌気的脱塩素化

嫌気条件下での PCB 分解に関する報告は、汚染現場での PCB の経時的減少パターン変化を示したのも(Chang et al, 2001, Fava et al, 2003)や、PCB 分解活性のある土壌を用いた PCB 混合物や単一 PCB 同族体の分解を示したものなど(Mohn and Tiedje, 1992, Wu et al., 1998, Palkar et al., 2003, Tiedje et al., 1993; Borja et al., 2005; Wiegel and Wu, 2000)、多くの報告がある(Table 1-9)。実験結果からも、嫌気的 PCB 分解反応においては、脱塩素反応が最も重要で主であると考えられている(Brown, 1987)。嫌気条件下におけるバイオレメディエーション技術として、嫌気性微生物による脱塩素化反応は非常に重要である。しかしながら、PCB 脱塩素化微生物に関しては、実験室内での取り扱いが難しいこともあり、未解明な部分が多い(Bedard and Quensen, 1995)。また、一般に現場における脱塩素化速度も 非常に遅いことが知られている(Sokol et al., 1994)。そのため、高い活性を有する嫌気性 PCB 分解微生物を獲得することは非常に困難なものと考えられてきた。

PCB の脱塩素化活性は、その土壌や底質の種類によって大きく異なっている。メタン生成条件(Ye et al, 1995)や、硫酸還元条件 (Zwiernik et al., 1998) など酸化還元電位の異なる環境でも、多様な PCB 脱塩素化活性が報告されている。すなわち、微生物群集によってその脱塩素化パターンも変化することがわかっている(Wiegel and Wu, 2000)。そこには、温度、pH、電子供与体・受容体となる基質の利用しやすさといった環境因子も、大きく影響している。加えて、PCB の生物利用効率自体もまた重要な影響因子である(Bedard et al., 1998)。

Table 1-9 Anaerobic PCB dechlorinating activities and consortium

Microbial source	PCBs	Main activities	Consortium	References
Bedford Harbor	Aroclor1242, 1254	*meta*, *para*		Alder et al, 1993, Quensen et al, 1990
Hudson River	Aroclor1242, 1254	*meta*, *para*, *meta*&*para*, 53% for 16 weeks	BES inhibition	Ye et al, 1992, Sokol et al, 1994, Quensen et al, 1988,1990, Zwiernik et al, 1998, May et al, 1992
Woods pond (Housatonic River)	Aroclor1260, 1254	76% for 16 weeks		Bedard et al, 1996, 2005, 2006
Silver Lake (Woods pond)	Aroclor1254, 1260			Quensen et al, 1990
Baltimore Harbor	2,3,4,5,6-, 2,3,5,6-, 2,3,4,5-CBP, Aroclor1260	*ortho*	*o*-17, DF-1, *Dehalococcoides*-like bacteria	Berkaw et al, 1996, Cutter et al, 1998&2001, Wu et al, 1998&2002, Yan et al, 2006
Starch&whey proceccing UASB*	Aroclor1260, 2,3,4,5,6-, 234-, 2,2',3,3',4,5,6-CBP	20% for 12 weeks		Natarjan, 1995, 1996&1998, Nollet, 2005
River Rhine (Chemie Harbour; Germany)	2,2',3,3',4,4'-, 2,2',3,3',6,6'-CBP			Hartkamp-commandeur et al, 1996
Di-Hua, Mi-Shi sewage plant (Taiwan)	2,3,4,5-CBP and other 10 congeners			Chang et al, 1998
Keelung River (Taiwan)	11 congeners			Chang et al, 2001
Tansui River, Erjen River (Taiwan)	Co-planar PCBs	80% for 75 weeks		Kuo et al, 1999
Porto Marghera (Venice Laggon; Italy)	2,3,4,5,6-CBP, Aroclor1242, 1254			Fava et al, 2003-1,2

Abbreviation, CBP: chlorinated biphenyl. * mark indicated PCB uncontaminated microbial source.

1.4.4 PCB 脱塩素化微生物

近年、*o*-17 (Cutter et al., 2001)および *Dehalobium chlorocoercia* DF-1 (DF-1:Wu et al., 2002)を含む高集積培養物が 2,3,5,6-TeCB を、*Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 (Fennell et al., 2004)が、2,3,4,5,6-HCB を脱塩素化することが報告された(Table 1-10)。また、Yan らは、*Dehalococcoides* 属細菌および *Dehalobacter* 属細菌がクローンとして検出された群集において、2,3,4,5-TeCB の脱塩素活性が見られたことを報告した(Yan et al., 2006)。しかしながら、脱塩素化活性が見られた PCB 同族体の構造は、限られていた。これは、PCB 同族体構造により性質が異なるため、微生物が各同族体を異なる化合物として認識している可能性を示唆している。現段階では、PCB 脱塩素化酵素やその生理学的性質も、未知である。

Table 1-10 Anaerobic PCB dechlorinating bacteria

Isolates/Uncultured bacterium	PCB	Reference
Dehalococcoides ethenogenes Strain 195	2,3,4,5,6-CBP	Fennell et al, 2004
DF-1 (*Dehalobium chlorocoercia* DF-1)	2,3,5,6-CBP	Wu et al, 2002
o-17	2,3,5,6-CBP	Cutter et al, 2001

Abbreviations, CBP: chlorinated biphenyl. ‘with’ indicated co-metabolisms for degradation.

1.5 研究の意義と目的

1.5.1 PCB 混合物を対象とする意義

PCB 同族体は、それぞれ異なる構造と性質を有するため、その分解機構を担う酵素反応における基質特異性の観点から、各同族体で異なる分解機構が必要だと考えられる。同時に、その分析・解析手法も困難を要する。また、PCB の嫌気的脱塩素化反応は、実験室での再現が難しいとされてきた。その理由は、その反応速度が非常に遅く、分解活性を長期維持できる培養条件設定が複雑であることが主であった。そのため、PCB 混合物に対する微生物分解を獲得することは、非常に困難である。しかしながら、日本における PCB 汚染状況は、KC-300、-400 といった PCB 混合物による極低濃度で広範囲に及んでいる。よって、PCB 混合物に対する嫌気的処理技術の確立が求められている。現段階では、PCB 混合物に対する嫌気脱塩素化活性の維持に成功し、その機能解析を進展させている報告は Bedard らのグループのみである(Bedard et al., 2006)。ナフタレンの嫌気分解反応(Zhang et al., 1997, Meckenstock et al., 2000)やビフェニルの嫌気分解反応(Natarajan et al., 1999)も報告されている。しかし、脱塩素反応を受け低塩素化した PCB が、嫌気条件下でさらに同時に完全分解される代謝経路は見つかっていない。

1.5.2 微生物群集を用いる意義

自然界においては、様々な微生物が群集として存在しており、それらの共生関係や群集構造、生存環境などが複雑に影響しあって生態系を形成している。実際の環境中には、多くの

競合する電子受容体となる物質が存在するため、単離した PCB 分解微生物が低濃度 PCB を電子受容体として利用しない可能性が高い。電子受容体となり得る化合物の複合汚染地を想定した場合、その実用性はさらに困難が予想される。また、脱塩素化反応には、塩素原子を置換する水素が必要である。その水素を供給するためには、環境中に存在する有機酸類を代謝して水素を生成する微生物種が必要である。水素授受反応を考えたとき、その水素分圧や微生物同士の空間的距離も最適でなければならない。そのため、環境中における PCB 混合物の分解技術の確立には、これらの諸課題をすべてクリアする必要性が求められる。

既知の PCB 嫌気的脱塩素化微生物は、単一 PCB 同族体もしくはその脱塩素化物の一部にのみ脱塩素活性を示すことが知られている(Fennel et al., 2004, Cutter et al., 2001, Wu et al., 2002)。そのため、PCB 混合物を微生物によって分解するためには、分解能力を有する複数の微生物を獲得する必要がある。過去の PCB 分解活性は、汚染環境試料を用いた例を中心に報告されてきた。その結果としてみられた PCB 分解活性は、一部の脱塩素化細菌近縁種の検出との相関が報告されているものの、直接分解活性を担う微生物種の特定には至っていない。一方、環境中では、脱塩素化された PCB の著しい蓄積がみられないことから、PCB を嫌気的に分解する能力を持った微生物が存在する可能性が考えられる。水田土壌では、水稲の植物遺体由来の難分解性物質として知られるリグニン類が、毎年蓄積することなく速やかに嫌気分解を受けている。リグニン類は、人体に無害な多環芳香族系物質であるが、その速やかな嫌気分解能は、PCB のような有機塩素多環芳香族物質の脱塩素化のみならず、嫌気分解まで期待されると考えた。

1.5.3 研究目的

本研究では、環境中に広く存在する低濃度広範囲 PCB 汚染を浄化するために、PCB 混合物の嫌気分解活性の獲得と、汚染現場への応用利用方法として、バリヤー型バイオレメディエーション技術の構築を目指した。バリヤー型バイオレメディエーション技術を構築するためには、①PCB 混合物に対する嫌気的分解活性の獲得、②安定した分解活性を得るための PCB 分解微生物群集の長期継代維持、③獲得した分解活性の向上と促進、④バリヤーのモデルとなる資材の調査、⑤得られた分解活性の特性評価、という 5 点を検討する必要がある。そこで、まず、PCB 混合物中の多種多様な PCB 同族体に対する幅広い活性を獲得するために、PCB 非汚染水田土壌を微生物源とした微生物群集獲得とその安定維持方法を検討した(第 2 章)。次に、獲得した PCB 混合物分解活性を向上し、その活性を担う培養条件や微生物種の特定と集積をいった(第 3 章)。また、その結果得られた PCB 混合物分解活性について、その PCB 混合物分解微生物群集の資材化を検討した。一方、PCB 混合物嫌気分解機構を解明するために、その取扱いに有利な土壌を含まない液体培養物の獲得を行った(第 4 章)。以上の研究を行うことで、PCB 混合物についての嫌気分解バリヤー開発の基礎知見を得た。

1.6 研究概要

2001 年から当研究室において、水田土壌を微生物源とした嫌気的 PCB 分解試験を開始した。用いた水田土壌は、愛知県下の PCB 汚染履歴のない強グライ土など 3 種類を供試した。その結果、4～6 ヶ月の長期培養を行うことで、嫌気条件下において約 50～100 μg の PCB 混合物の消失活性が確認された。しかし、その消失活性は、同条件のサンプル間で大きなばらつきがみられ、嫌気的消失活性は不安定であった。また、たとえ有意な結果が得られたとしても、サンプルは全量抽出に供試したため既に消滅しており、詳しい微生物学的な解析等に応用することが不可能であった。そこで、この嫌気的 PCB 分解活性を安定的に獲得・維持し、微生物学的解析を進めるために、非常に困難が予測された PCB 混合物に対する嫌気的分解活性の継代維持技術を開発した。その結果、水田土壌培地(後述)への培養物土壌懸濁液の継代培養により、分解活性の長期維持に成功した。56 日継代培養における平均分解率は約 14 mol% で分解活性にはばらつきも見られたが、PCB 混合物にふくまれるほとんどの PCB 同族体に対する有意な分解活性の獲得に成功した(第 2 章)。

次に、本分解活性を向上させるために、培養条件を検討した。培養期間、温度、pH、酸化還元電位、電子供与体、土壌粒径のいずれの影響も小さかったが、土壌酸化度、土壌残留有機物を改変した培地(焼成土培地)を用いたところ、全 PCB 分解率が約 2.5 倍向上した高分解活性微生物群集を獲得した。この焼成土培養物の分解活性は、広範囲の PCB 同族体に対する分解活性を示し、低塩素化物の蓄積等もみられなかった。しかも、培地成分を再添加することでその分解活性がさらに進行することも確認された。また、この培養物における特性評価により、分解活性に関与する微生物種を推定した。一方、獲得された高活性を実汚染環境に施用する技術的基礎知見を得るために、モデル資材を微生物包埋用の担持資材として、微生物群集の資材化を検討した(第 3 章)。

PCB 混合物の嫌気的分解活性に関して、その分解メカニズムや分解微生物種を解明するために、液体培養物の獲得を行った。液体培養物の獲得には、土壌代替物としての無機素材(ガラスビーズ)を用いることで、安定的に液体培養物を獲得できることがわかった。また、粒径の違いによって、微生物群集構造および分解活性への影響がみられたことから、PCB 混合物分解微生物にとっての最適生息空間サイズを研究した。さらに液体培養物を用いて、分解活性制御因子の追及と、PCB 混合物の最高分解活性も試験した(第 4 章)。

本研究で獲得された嫌気性 PCB 分解微生物群集構造は、呼吸鎖キノンプロファイル法と 16S rRNA 遺伝子における PCR-DGGE 法(Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis)を併用し解析した。その結果、各培養物に共通して *Firmicutes* 門の高集積化が見られた。また、既知の脱塩素化菌である *Dehalococcoides* 属、*Dehalobacter* 属、*Desulfitobacterium* 属の 3 種に関しては、脱塩素活性とその存在の相関は得られなかった。本培養物の特性評価から、硫酸還元細菌が PCB 混合物の分解活性に強く関与することが示唆された。

第 2 章　非汚染水田土壌を微生物源とした PCB 混合物の嫌気分解活性の獲得と継代維持

2.1 概要

当研究室において、3 種類の PCB 非汚染水田土壌を微生物源として、嫌気条件下における PCB 混合物分解活性の有無を試験した。培養は、各種電子供与体あるいは受容体を添加した基本塩類培地と、硫酸塩を含んだ特殊培地を用いて行い、4〜6 ヶ月の長期静置培養を行なった。その結果、4 ヶ月以上の嫌気培養によって 10〜30 weight%(全 PCB 混合物約 50〜150 μg)の PCB 混合物消失活性を見出した。この消失活性は、同条件のサンプル間で大きなばらつきがみられ、嫌気的消失活性は不安定であったが、滅菌処理を施したサンプル中では見られなかったことから、微生物による分解であると考えられた。しかし、その実験系では、PCB の分析のためにサンプル全量を抽出したため、有意な分解活性が得られたサンプルも分析に使われてしまい、分解活性を再現することも、詳しい微生物学的な解析等に応用することも不可能であった。そこで、この嫌気的 PCB 混合物分解活性を安定的に維持するために、分解活性の長期継代維持技術の開発を行った。

脱塩素反応が期待される嫌気性微生物の活性維持は、これまでに成功した報告例も少なく、非常に困難が予測された。しかし、活性を見出した培養状態を再現すべく、培養物土壌懸濁液を水田土壌培地へ継代することで分解活性維持に成功した。継代維持に成功した培養物では、56 日間隔の継代培養で、平均 14 mol%の全 PCB 混合物が分解され、添加した PCB 混合物中のほとんどの同族体に対して有意な分解活性が確認された。本培養物は、継代ごとにばらつきも見られたが、13 回以上の継代培養で 3 年以上分解活性を維持に成功した。

本水田土壌培地における嫌気的 PCB 混合物分解微生物群集は、呼吸鎖キノン解析法と 16S rRNA 遺伝子における PCR-DGGE 法を併用し解析した。キノン解析結果から、メナキノン-6 及び-7 のみが検出されたことから、*Firmicutes* 門および、*Deltaproteobacteria* 綱、*Epsilonproteobacteria* 綱を優占種とすることが推定された。また、PCR-DGGE およびそのクローニング解析結果からも、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱および *Chloroflexi* 門の微生物種が検出された。一方、既知の脱塩素化菌である *Dehalococcoides* 属、*Dehalobacter* 属、*Desulfitobacterium* 属の 3 種に関しては、脱塩素活性とその存在の相関は得られなかった。また、培養条件によってメタン生成も確認されたが、メタン生成量と PCB 分解活性に相関が見られなかったことから、メタン生成細菌の PCB 分解活性への関与も低いことが推察された。このことから、本嫌気的 PCB 分解活性を担う微生物群集は、*Firmicutes* 門の微生物種が優占化していることがわかった。

2.2 実験方法

2.2.1 PCB

本実験では、今回使用する土壌試料に含まれる微生物がどのような PCB を特異的に分解するか幅広く検出するため、PCB 混合物を使用した。PCB 混合物は、鐘淵化学工業製 KC-300 と KC-400 を重量比 1：1 で混合したものを使用した。この PCB 混合物は、2 から 7 塩素化 PCB 同族体を 50 種類以上含み、特に毒性が問題視されている 5 塩素化 PCB や、環境中から広く検出される 3 塩素化物(39.9%(w/w))と 4 塩素化物(44.4%(w/w))からなる。PCB 混合溶液は、アセトン溶媒を用いて 1000 mg/l 標準溶液として使用した。

2.2.2 環境試料

幅広い嫌気分解活性に期待して、愛知県下の土壌成分の異なる 3 箇所の水田土壌を採取し、微生物源として供試した。①操出土壌：中粗粒強グライ土で愛知県海部郡弥富町操出の水田土壌。以下、操出(くりだし)土壌と表記。②長久手土壌：黒ボク土で愛知県愛知郡長久手町名古屋大学付属農場の水田土壌。③弥富土壌：中粗粒グライ土で愛知県海部郡弥富町の水田土壌。これらの土壌は、表層下 10 cm～30 cm の還元層を採取し、2 mm の篩掛けをした後、湛水条件下で 22°C、2 ヶ月間暗条件で静置保存した。これらの水田土壌は、PCB 汚染履歴もなく、土壌中から PCB は一切検出されなかった。

2.2.3 PCB 分解培養物の調製

乾熱滅菌(180°C, 3 hour)済みの 600 ml のガラスバイアルに、乾燥重量当たり 17 g の試料土壌をスラリー状態で 20 ml 加えた。そこへ、500 µl の PCB 混合アセトン溶液(1 g/L)と後述する培地 80 ml を添加した。このバイアルを、テフロンライナー付ゴム栓をアルミキャップで密閉し、気相を窒素置換した後、暗条件、30°C において 4～6 ヶ月静置培養を行った。

本実験では、mineral salts (MS)培地と acetate-lactate (AL) 培地の 2 種類の培地を試験した。MS 培地の組成(g/l)は、K_2HPO_4 0.27, KH_2PO_4 0.35, $(NH_4)Cl$ 2.7, $MgCl_2・6H_2O$ 0.1, $FeCl_2・4H_2O$ 0.02, $CaCl_2・2H_2O$ 0.1, Yeast extract 2.0 である。嫌気指示薬として、レサズリン 1 mg/l を添加した。培地中の pH は、KOH を用いて 7.0 に調整した。電子供与体と電子受容体の影響を調査するために、電子供与体として、グルコース、酢酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、エタノールを用い、電子受容体として、硝酸ナトリウム、塩化鉄(Ⅱ)、二酸化マンガン、硫酸ナトリウムをそれぞれ 100 mM ずつ別々に MS 培地に添加し比較検討した。AL 培地の組成(g/l)は、K_2HPO_4 0.5, $(NH_4)SO_4$ 0.5, $MgSO_4・7H_2O$ 0.1, $FeSO_4・7H_2O$ 0.02, Yeast extract 0.5, 酢酸ナトリウム 8, 乳酸ナトリウム 10 である。AL 培地も、嫌気指示薬として、レサズリン 1 mg/L を添加し、pH は、KOH を用いて 7.0 に調整した。MS 培地と AL 培地は、使用前に水中に溶けている酸素を除去するために、窒素爆気を行った。培地成分の違いによる影響を評価するために、培地の代わりに窒素爆気した滅菌水を添加し、

比較した。いずれの条件も 2 連で比較した。以下、本培養物は、水田土壌培養物と呼ぶ。試薬類は、シグマアルドリッチジャパンで購入した。

2.2.4　PCB 分解活性維持方法

PCB 分解活性の維持は、前節で構築した水田土壌培養物の 5 分の 1 スケールで行い、その接種源は、操出水田土壌培養物を用いた。培養に使用したガラスバイアルは、100 ml で、使用前に乾熱滅菌処理を行った。PCB 分解活性を維持するため、培養サンプル中の活性微生物群を新しい培地に移す継代培養を行った。接種作業の際、一時的に外気の酸素と接触するなどの環境の変化が分解活性に直接的に影響することが懸念された。そこで、大気中の酸素影響を最小限にとどめるために、嫌気性チャンバー(Flexible vinyl chamber, TYPE-A, Coy Laboratory products, Grass Lake, MI, USA)を使用した。嫌気性チャンバーは、大きな風船状装置でその内部気相条件を任意の嫌気条件にすることができる。当研究室では、その条件を窒素：二酸化炭素：水素＝80：15.1：4.9 とした。以下の作業は、この嫌気性チャンバー内で行った。ガラスバイアルへ乾燥重量当たり 3.5 g の操出水田土壌(Paddy soil; PS)をスラリー状態で 4 ml 加えた。この土壌スラリーは、使用前にオートクレーブ処理(121°C, 30 min)を 3 日間連続で施した。この土壌に対して、100 µg の PCB 混合物(すなわち 100 µl の PCB 混合アセトン溶液(1 g/L))と、AL 培地 15 ml を加え、テフロンライナー付ゴム栓をアルミキャップで密閉し、気相を窒素置換した(AL 培地を含むこの土壌培地を PS(Paddy soil)培地とした)。

分解活性は、前節で構築した PCB 分解能を確認した水田土壌培養物を、この PS 培地へ土壌懸濁液として 5% (v/v)接種することで維持を試行した。56 日培養後、この培養物を再び新しい PS 培地へ土壌懸濁液として 5% (v/v)接種することで、継代維持を行った。いずれも 2 連以上で試験した。PS 培地における培養物を、PS 培養物を呼ぶ。

本 PCB 分解活性が、微生物による分解であることを確かめるために、オートクレーブ処理後、0.1%のパラホルムアルデヒド溶液(細胞固定液)を添加した殺菌コントロール培養物も調製し、同条件下で培養した。

PCB 分解活性を維持するための継代培養方法として、最低限必要な微生物源接種量と継代培養期間について検討した。微生物源接種量は、新しい PS 培地に対する接種量を、0%、1%、5%、10%、50%に設定してその影響を比較した。継代培養期間は、56 日を最長として、14 日、28 日の結果と比較した。いずれの条件も、前節で構築した PCB 混合物を分解する水田土壌培養物を接種源とし、1 年近く培養したことで既に集積のかかったことに期待して設定した。

2.2.5　PCB 残留物とキノン画分の同時抽出法

微生物群集構造解析法のひとつである呼吸鎖キノン抽出法は、土壌サンプルから親油性物質を抽出する方法である。PCB は、高い親油性を持つ物質であることから、キノン画分と同時に PCB 画分を抽出できる PCB-キノン併用抽出法を開発した。

まず、サンプルバイアルをよく振り混ぜ全量遠沈管に移し遠心(8000 rpm, 10 min)により土壌のみを沈殿させた。上清は、あらかじめ *n*-ヘキサン(特級ヘキサンを蒸留したもの。以下ヘキサンとはこの蒸留ヘキサンを指す。) 80 ml が加えられた分液ろうとへ移した。沈殿土壌は、バイアル壁面に残った土粒子や PCB をクロロホルム/メタノール(それぞれ特級溶媒を蒸留したものを 2:1 で混合したもの)20 ml とともに 10 分間超音波抽出を行い遠心により土壌を沈殿させ、水層を先ほどの分液ろうとに、有機溶媒層はナス型フラスコに移した。この操作を計 3 回繰り返した。ナス型フラスコ中の有機溶媒を、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で減圧濃縮した。濃縮液を分液ろうとに移し、振とうにより PCB-キノン画分のヘキサン展溶を行った。残った水層をもう一度ヘキサン展溶した。得られたヘキサン画分を無水硫酸により脱水処理し、ヘキサン溶媒をエバポレーターで濃縮した。このヘキサン濃縮液を、シリカゲルカラム(Sep-Pack Plus Silica cartridges; Waters, Milford, MA, USA)によって精製した。各画分は、極性の低い順番に、PCB 画分(ヘキサン溶出)、メナキノン画分(2%ジイソプロピルエーテル)、ユビキノン画分(10%ジイソプロピルエーテル)をそれぞれ溶出させた。

2.2.6　PCB 残留物の定量

PCB 画分は、ヘキサンを用いて不活性化フロリジルカラムを用いて精製を行った。得られた精製液をヘキサン濃縮し、PCB-ヘキサン精製液を調製した。これを、濃硫酸処理、ヘキサン洗浄水(超純粋をヘキサンで洗浄したもの)処理し不純物を除去した。この PCB 残留液は、ガスクロマトグラフィー(Gas chromatography; GC)で定量した。GC 分析における妨害ピークを低減するために、実験器具はあらかじめすべてヘキサンで 3 回洗浄してから使用した。

PCB の分析は、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィー(^{63}Ni electron capture detector 付き GC; GC/ECD, GC2014, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた(*1 参照)。使用したカラムは、HT8 (0.22 mm inner diameter, 50 m length, 0.25 μm film thickness; SEG, Austin, TX. USA)で、キャリアーガスとして流速 0.1 ml/min のヘリウムガス(Grade 1)を、メイクアップガスとして流速 30 ml/min の窒素ガス(Grade 2)を使用した。インジェクター温度と検出器温度は、それぞれ 250°C と 330°C に設定した。カラムの昇温プログラムは、80°C で 3 分保持し、次に 170°C までは 30°C/min、その後 300°C までは 3°C/min で昇温し、300°C で 10 分保持する条件とした。

PCB 同族体は、KC-300/400 混合物の標準溶液を分析し、標準溶液中に含まれる PCB 番号を検出時間とピーク番号で照合した。まず、質量分析器付き GC(mass spectrometer 付き GC; GC/MS, GC-17A-MS QP-5050, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて標準液を分析し、各同族体の質量数を同定した(各ピークの置換塩素数の確認)。分析条件は、GC/ECD 分析条件と同条件とした。質量分析は、70 eV の電子衝突イオン化条件で検出した。各同族体の絶対含有量を計算するために、同試料を水素イオン化検出器付き GC(flame ionization detector 付き GC; GC/FID, GC-14B, Shimadzu, Kyoto, Japan)で分析し、水素炎中で燃焼されたイオン量から PCB の炭化水素量を求め、検量線を作成した(各ピークの炭化水素量の確認 : 絶対量の確認)。GC/ECD は、試料中の微量な PCB に対して、その塩素付加量に応じて各同族体を高感度に検出できること

から、同試料に対する GC/ECD 検出による検量線も作成した。両検量線を用いて、ECD 分析で得られた各ピーク面積に対する、FID 分析で得られた各ピーク面積を換算することで、ECD で検出された各ピーク面積に対する各同族体の成分割合(CB%)を求めた。この作業によって、GC/ECD による高感度分析から、PCB 各同族体の絶対量を算出した。

GC/ECD は、その特性によって、分析時の感度が変動することがある。そこで、PCB 分析時の感度校正用内部標準物質として、KC-300/400 に含まれていない IUPAC 番号(以下#で示す)199 の同族体を使用した。分析データの採取と解析は、Shimadzu Class GC Station(Shimadzu, Kyoto, Japan)で行った。分析は、少なくとも 2 回以上行った。

各 PCB 同族体の含有量は、KC-300/400 混合物 100 μg を添加した培養物中で、同族体あたり 35.7 ng を検出限界とした。ただし、分析時の#56、#60 のクロマトチャート上のピークは、土壌抽出物中の阻害物質が妨害ピークとなり、正確な定量ができない場合があったため、解析時に全分析結果から除外した。本実験で同定した PCB 同族体は全 42 種で、その一部は、複数の同族体が重複ピークとして検出された。ただし、GC/MS 分析により得られたスペクトルから、複数同族体中の含有割合の高い同族体を先頭に示した(ex) 20/33/45)。本研究で使用した KC-300/400 混合液中には、PCB 混合物の分析指標となる 7 つの PCB 同族体#28、#52、#101、#118、#153、#180 が含まれていた(Takasuga et al., 2005)。このうち#153 と#180 の 2 種の同族体の KC-300/400 混合液における理論上の含有量は、100 μg 中それぞれ 18.9 ng と 10.0 ng であったが、いずれも分析時の検出限界未満であったため、解析時に除外した。

上記の方法で合算した PCB 同族体量は、Kim ら(2004)によって報告されている KC-300/400 混合物の理論値の 83%に相当した。この計算によって得られた PCB 量の合算値を、本実験で用いた全 PCB 混合物 100%とした場合、クロロホルム/メタノール抽出法による添加回収率は、92.9%±5.5%であった。各同族体別の回収率は、少なくとも 76.6%以上であった。

PCB 分解活性は、培養期間終了後の殺菌コントロール培養物中の PCB 残留量を 100%として、培養後のサンプル中の PCB 残留量を比較した。計算方法は、全 PCB 重量を合算比較した全 PCB 残留率(weight%)、各 PCB 同族体別にその PCB 重量を分子量換算した mol%、およびそれを合算比較した全 mol%で評価した。また脱塩素活性を評価する場合には、重量/分子量換算では、その変化を評価することが困難な場合が考えられる。そこで、各 PCB 同族体について、その培養前後で変動した重量を塩素原子量に換算することで、脱塩素化率も評価した。これらの計算方法は、その活性をわかりやすくするために、残留量(率)、分解量(率)、脱塩素化率として適宜選択し結果に示した。

PCB 分解活性の有意性を証明するために統計学的解析を行った。培地、電子供与体および電子受容体、接種率、培養期間の影響を比較するために、Scheffe の多重比較に基づく分散分析(F 統計)によって評価した(*2 参照)。また、継代培養によって維持された各同族体の有意な分解活性に関しては、Aspin-Welch 解析によって評価した(*3 参照)。

*1　GC/ECD：ハロゲン化合物などの親電子性の大きい特定の物質に対して選択的に極めて高い感度を有する。ECD セル内には板状のβ線源(^{63}Ni)があり、キャリアーガスがイオン化されるため、常時一定の電離電流が流れている。ここへ親電子性化合物の分子が流入することで、電子を捕獲して負イオンが出来る。負イオンは、電子に比べ電極への移動速度が遅く、かつ陽イオンとの再結合の確率も大きいため、電離電流は減少する。その減少信号を増幅し、記録計に反転記録したものが ECD のクロマトグラムである。このため、絶対量を把握することは困難である一方、ハロゲン化化合物に対する感度が非常に高いことから、塩素系残留農薬、PCB、有機水銀、水道水中のトリハロメタンなど、環境汚染物質の微量分析の有力な手段となっている。

*2 Scheffe 多重比較：F 統計とは、統計法の総称である。F 値の有意性とは、母集団の平均値がおそらく等しくないということだけを示すが、この段階ではどこに差異があるかを指摘しない。そこで多重比較検定という方法で、どの母集団の平均値が互いに異なるのかを調べることになる。Scheffe 法は、n 個の各群におけるすべての対比の中で、有意なものをさがす検定(non-parametric)で、一組の平均値を比較した場合に、より慎重に有意性を判定する。他に Bonferroni 比較法などがあるが、Scheffe 法が最も厳しく有意差を検定することから、ここで得られた有意差は、信頼度が高い。

*3 Aspin-Welch 解析：t 検定とは、標本数に対する自由度の正規分布している t 分布を利用した 2 群の母平均に差を検定する方法である。分散・標準偏差など分布を利用した手法でパラメトリック検定である。有意差検定には、一標本の場合と二標本の場合がある。一標本検定は、標準誤差の割合を検定するのみで、一般的には二標本検定が用いられる。2 群間の平均値の差は、t 分布を利用して解析する。分布の正規性は、一般に分散の同一性を検定する(F-検定で等分散性・分散比を把握)。両群の分散と標本数が同一の場合は Student の検定、同一標本で分布が異なる場合は Aspin-Welch の検定、表本数および分布が異なる場合は Chocran-Cox の t 検定をそれぞれ用いるが、Aspin-Welch 検定を実施した例が多い。有意差の限界は 5%水準である。

2.2.7 呼吸鎖キノン解析方法

キノン画分は、窒素風流下で乾固し、分析時は 100 µl のアセトンに溶解後分析に供した。ZORBAX ODS カラム(4.6 mm inner diameter, 250 mm length, Wilmington , DE USA)を 2 本接続したフォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatograph equipped with a photodiode array detector)を用いた。分析時の溶離液は、メタノール：イソプロパノール=9：2 とし、流速は 1.0 ml/min とした。ユビキノンとメナキノンの検出波長は、それぞれ 275 nm、270 nm とした。分析・解析方法の詳細は、要略した(Katayama and Fujie, 2000)。

2.2.8　気相分析方法

培養物の気相中におけるメタンの検出は、SUS カラム Porarpak Q ZP-20 80/100 (3.0 mm inner diameter, 3.0 m length, Waters, Milford, MA, USA)を接続した GC/FID(GC-14B, Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて行った。ヘリウムガス(1.0 ml/min)と高圧空気(30 ml/min)を、それぞれキャリアーガスとメイクアップガスとして用いた。インジェクター及び検出器温度は、140°C とし、カラム温度は、70°C とした。気相 100 μl 中の検出限界濃度は 0.1 mol%であった。

2.2.9　DNA 抽出と PCR-DGGE 法

培養物のゲノム DNA は、ISOIL extraction kit (Nippon gene, Tokyo, Japan)を用い、その使用説明書に従い抽出した。*Bacteria* をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子は、プライマー341F (5'-cgc cgg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg gggg cct acg gga ggc agc ag-3'；下線部は GC clamp に相当する) と 518R(5'-att acc gcg gct gct gg-3')を用いて大腸菌の rRNA 位置で 341 番目から 518 番目に相当する遺伝子断片を増幅した(Myzer et al., 1993)。PCR 増幅は、200 μl チューブで 100 μl スケールで行い、サーマルサイクラー(Takara-Bio, Shiga, Japan)は、以下のプログラムを設定した；94°C 3 min→｛94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 1 min｝を 35 サイクル、72°C 10 min。反応液は、以下の組成とした；プライマー341F/518R (50 pmol/ μl each)、2.5 U Mg^{2+}-free Extaq DNA polymerase (Takara-Bio, Shiga, Japan), 10 μl *Extaq* buffer (20 mM Mg^{2+}; Takara-Bio, Shiga, Japan), 10 μl dNTP mixture (2.5 mM each dNTP), 1-2 μl DNA template (24-35 ng), 74 μl 滅菌水。PCR 産物は、エチジウムブロミド染色し、一般的な電気泳動によって目的の DNA 断片サイズを確認し、DNA 濃度を推定した。この 16S rRNA 遺伝子断片の PCR 産物(約 0.2 μg)を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動へ供した。このゲルは、ホルムアミドを含むポリアクリルアミドゲルで、尿素の濃度勾配を 40%から 70%としたものである(Table 2-1)。電気泳動は、0.5xTAE バッファー(20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM Na_2-EDTA, pH8.0)中で、100 V 行って電圧下で、60°C、14 時間泳動した。泳動後、ゲルは、SYBER green I (Molecular probes, Engene, OR, USA)で染色し、UV トランスイルミネーターで DNA 断片パターンを視覚化した。

2.2.10　DNA シーケンスと系統学的解析

PCR 産物は、Wizard Plus Minipreps DNA purification System (Promega, Madison, WI, USA)を用いて精製した。また、精製された DNA 断片は、pTBlue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen, Madison, WI, USA)を用いてランダムクローニングを行った。クローニングされたプラスミド DNA は、Templiphi plasmid amplification kit (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA)を用いて複製した。いずれの手順も、取扱説明書に従って作業した。増幅された DNA は、2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色し、UV トランスイルミネーターで視覚化し確認した。16S rRNA のクローン断片は、DNA シーケンサー(ABI 3100, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)で配列を確認した。この DNA 配列は、GENETYX プログラム (Version 7, Software Development Co., Tokyo, Japan)で解析し、NCBI-BLAST データベースの

BLAST サーチプログラム(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)を用いて 16S rRNA 配列と相同性検索を行った。

Table 2-1 Composition of the gel solution for DGGE

DGGE gel solution	
40% Detergent AA solution	
*0% Formamide AA solution	6.5 ml
**80% Formamide AA solution	6.5 ml
APS	117 μl
TEMED	11.7 μl
70% Detergent AA solution	
*0% Formamide AA solution	1.6 ml
**80% Formamide AA solution	11.4 ml
APS	117 μl
TEMED	11.7 μl
*0% Formamide AA solution (/l)	
40% AA solution***	250 ml
50×TAE	20 ml
**80% acrylamide solution (/l)	
40% AA solution***	250 ml
50×TAE	20 ml
Formamide	320 ml
Urea	336 g
***40% AA solution (/l)	
50×TAE	10 ml
Acrylamide	390 g
Bis-acrylamide	10 g

APS: Ammonium pertoxodisulfate (0.1% w/w)

TEMED: N, N, N’, N’-tetramethylenediamine

TAE; 20 mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM Na_2-EDTA, pH8.0

2.2.11 脱塩素化微生物の 16S rRNA 遺伝子の検出

PCR を用いて、培養物から抽出されたゲノム DNA 中における既知の脱塩素化菌の遺伝子配列の検出を行った。*Dehaloccocides* 属近縁種の検出は、吉田らにより報告された方法で、特異的検出用 PCR プライマーセット 793F(5’-ggg agt atc gac cct ctc tg-3’)と 946R(5’-cgt tyc cct ttc rgt tca ct-3’)を用いて行った(Yoshida et al., 2005)。サーマルサイクラーのプログラムは以下の通り；94°C 3 min→｛94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min｝を 30 サイクル、72°C 8 min。また、同 PCR 条件下で、*Dehalobacter* 属近縁種及び *Desulfitobacterium* 属近縁種の検出も行った。

用いた特異的検出用プライマーセットは、Smits らによって報告されており、*Dehalobacter* 属検出用の 441F(5’-gtt agg gaa gaa cgg cat ctg t-3’)と 645R(5’-cct ctc ctg tcc tca agc cat a-3’)、*Desulfitobacterium* 属検出用の 406F(5’-gta cga cga agg cct tcg ggt-3’)と 619R(5’-ccc agg gtt gag ccc tag gt-3’)をそれぞれ使用した。

2.2.12 遺伝子配列の登録

本実験で得られた遺伝子配列は、日本 DNA データバンク(DDBJ；DNA data bank of Japan)に登録した。登録番号は、AB259666 から AB259674 である。

2.3 結果

2.3.1 水田土壌培養物中の PCB 分解活性

Table 2-2 に、4 ヶ月と 6 ヶ月培養後の 3 種の水田土壌培養物における PCB 残留率を示した。4 ヶ月培養におけるでは、いくつかの培養条件では、殺菌コントロール培養物に対する PCB 残留率の有意な減少がみられた。6 ヶ月培養における操出水田土壌培養物中では、全ての培養条件で全 PCB 残留率の有意な減少がみられた。殺菌コントロール培養物中では、減少がみられなかったことから、これらの減少は、微生物活性による嫌気分解であることが考えられた。本実験で使用した 3 種の土壌において、PCB の分解活性が示されたことから、PCB 非汚染水田土壌には、PCB 混合物を嫌気的に分解する能力を含むことが示唆された。

6 ヶ月培養した操出水田土壌培養物では、電子供与体および電子受容体の違いによる PCB 混合物分解活性への影響はみられなかった(Table 2-2)。MS 培地において、電子供与体および電子受容体を一切添加しなかった培養物においても、有意な PCB 分解活性がみられたことから、水田土壌そのものが嫌気的 PCB 分解活性に必要な栄養源を供給できることが示唆された。本実験で供試した全培養物条件のうち、PCB 残留率が最も少なかった条件は、AL 培地を添加した水田土壌培養物であった。そこで、この AL 培地添加水田土壌培養物を分解活性の継代維持を検討する際の微生物接種源とした。

6 ヶ月培養後の操出水田培養物中の気相中のメタン生成量を測定したところ、酢酸を電子供与体として添加した培養物中のメタン濃度は、13.5 mol%であった。同乳酸添加系では 5.2 mol%、同ピルビン酸添加系では 14.1 mol%、同プロピオン酸添加系では 15.1 mol%、非添加培養系でも 5.2 mol%のメタンが検出された。この他の電子供与体を含む培養物中におけるメタン濃度は、4 mol%以下、もしくは検出限界未満であった。AL 培地を添加した水田培養物中にはメタンは検出されなかった。これらの結果から、6 ヶ月培養後の操出水田土壌培養物におけるメタン生成量について、PCB 分解活性との相関は得られなかった。

Table 2-2 Total residual PCBs in Kuridashi paddy soil cultures supplemented with MS or AL medium after four or six months of incubation

	Total residual PCBs (% w/w)			
	Kuridashi		Nagakute	Yatomi
	4 months	6 months	4 months	4 months
MS-medium				
Glucose	95.6	83.2**	96.7**	92.8
Lactate	94.4	82.6**	87.4*	88.2**
Pyruvate	98.4	81.7**	87.7*	–
Acetate	97.5	80.6**	88.3*	91.0*
Propionate	98.0	80.0**	90.1	–
Ethanol	98.7	81.6**	95.6	–
Nitrate	99.0	74.9**	98.2	96.3
Mn(IV)	98.2	81.8**	98.7	–
Fe(III)	100.0	82.8**	96.6	–
Sulfate	102.3	81.5**	100.7	96.0
None	98.3	83.2**	89.7	95.5
AL medium	89.2***	72.5**	95.3	97.2

MS medium: mineral salt medium, AL medium: acetate and lactate medium; see text for the composition. –: not tested. Total residual PCBs are shown as % (w/w) of the amount in the sterilized control after the same incubation time. The values were the average of between two and seven determinations using separate incubation vials. Statistical significance of decreases in the total residual PCBs compared with sterile control was examined by analysis of variance (F-test) followed by a Scheffe multiple comparison. The symbols *, ** and *** denote a significant difference at < 5%, < 1% and < 0.1%, respectively.

2.3.2 PCB 分解活性維持とその特徴

操出水田土壌培養物で獲得した PCB 混合物分解活性を維持するために、殺菌操出土壌に AL 培地を加えた PS 培地を用いて、微生物源の接種量と継代培養期間の違いによる影響を試験した。その実験結果を Table 2-3 に示した。有意な PCB 分解活性は、5%および 50%の接種率で 56 日培養した場合にみられた(共に P< 0.01)。接種率が 10%の場合は、結果におけるばらつきが大きいために統計学上の有意差は見られなかったが、分解活性はみられた。次に、継代培養間隔を決定するために、接種率を 5%に固定し、14 日ごと、28 日ごと、56 日ごとで PCB 分解活性を試験した。その結果、56 日間隔の継代培養とした場合にのみ有意な PCB 分解活性がみられた(P< 0.01)。これらの結果から、接種率を 5%とし、継代間隔を 56 日とすることで、AL 培地を添加した操出水田土壌培養物中の嫌気的 PCB 分解活性を継代維持できることがわかった。一方、土壌を含まない培地では、本 PCB 分解活性の継代維持が困難であったことから、本分解活性は、安定的な分解活性の維持には、培地として水田土壌スラリーを含むことが必要であることがわかった。よって、土壌は、微生物群集にとって生息場として

の役割を果たしている可能性が示唆された。

Table 2-3 Effects of inoculation rate and incubation interval on the total residual PCBs in Kuridashi paddy soil cultures.

Inoculation rate (% v/v)	Incubation interval (days)	Total residual PCBs (% w/w)
0	56	101.3
1	56	100.0
5	56	86.8**
10	56	79.4
50	56	70.7**
5	0	100.0
5	14	99.9
5	28	92.4
5	56	86.8***

Total residual PCBs are shown as % (w/w) of the amount in the sterilized control after the same incubation time. The values are the average of between two and seven determinations using separate incubation vials. Statistical significance of amounts of total residual PCBs compared with sterile control was examined by analysis of variance (F-test) followed by a Scheffe multiple comparison. The symbols *, ** and *** denote a significant difference at < 5%, < 1% and < 0.1%, respectively.

上記した方法によって、PCB 汚染履歴のない操出水田土壌中における PCB 混合物の嫌気的分解活性の継代維持に成功した。56 日培養で 13 回継代培養した培養物中の、コントロールと比較した平均 PCB 残留量は、84.8±9.9 mol% (85.7%±10.6% (w/w))であった。また、平均脱塩素化率は、14.0±10.3 mol%であった。これらの減少は、統計学的にも有意であった(共に P< 0.01)。しかし、PS 培地は塩化物イオンを多く含むために、培養後の液層中における遊離塩化物イオン濃度には、増加が見られなかった。そのため、PCB 脱塩素化反応に起因する塩化物イオン濃度変化は、証明できなかった。

継代培養によって維持された 56 日培養後の PS 培養物中の各 PCB 同族体の残留濃度(mol%)を Table 2-4 に示した。添加した PCB 混合物に含まれる PCB 同族体の多くが、コントロールと比較して有意に減少した。ただし、その残留濃度は、継代ごとにばらつきがみられた。これらの結果から、PCB 同族体の残留濃度変化は、微生物分解によるものであることが示唆された。PCB 同族体#26/#50、#41 および#46 における分解は、残留率におけるばらつきが大きいため有意性が得られなかった。低塩素化同族体である#6、#16、#17 および#32 の残留率は、100%以上であった。これは、本培養物中での低塩素化同族体の蓄積を示唆している。また、微生物分解は、*meta*-、*para*-塩素化同族体だけでなく、*ortho*-塩素化同族体にもみられた。このことは、PCB 同族体の塩素置換位置に関係なく広範囲の PCB に対する嫌気的微生物分解活性を有することを示唆している。

Table 2-4 Residual amount of individual PCB congeners (mol%) in Kuridashi paddy soil cultures after 56 days of incubation averaged over 13 serial transfers of an anaerobic PCB-degrading culture.

IUPAC number	Substituted positions of Cl	mol% in initial PCB mixture	Residual amount (mol%)	±	SD	Significant difference
6	2-3	1.0	114.8	±	16.8	*
8	2-4	5.3	84.9	±	26.8	*
16	23-2	2.7	66.9	±	35.2	**
20/33/45	23-3/34-2/236-2	7.2	81.3	±	9.2	***
17	24-2	2.8	101.6	±	13.3	
28/53	24-4/25-26	9.9	82.3	±	9.7	***
18	25-2	7.8	93.7	±	10.9	*
26/50	25-3/246-2	1.1	91.8	±	21.8	
31	25-4	9.9	85.3	±	8.6	***
32	26-4	2.2	98.4	±	16.2	
44	23-25	5.6	87.1	±	9.8	***
46	23-26	7.6	87.1	±	50.2	
49/43	24-25/235-2	3.6	86.7	±	12.0	***
66	24-34	5.2	82.1	±	9.1	***
52/69	25-25/246-3	6.5	82.2	±	9.9	***
70	25-34	6.1	85.0	±	9.4	***
72/64	25-35/236-4	1.9	81.5	±	15.5	***
41	234-2	0.6	85.7	±	40.6	
74/95	245-4/236-25	4.5	75.9	±	9.8	***
105	234-34	0.9	65.2	±	29.6	***
110	236-34	1.0	86.8	±	12.7	***
97/117/86	245-23/2356-4/2345-2	0.8	89.1	±	11.4	**
101/150	245-25/236-246	1.6	73.9	±	18.1	***
118	245-34	1.5	76.7	±	10.2	***
103/71	246-25/26-34	1.3	78.5	±	14.4	***
138	234-245	0.3	83.2	±	17.9	**
136	236-236	0.2	73.8	±	23.1	***
149/77	236-245/34-34	0.8	81.1	±	10.6	***
176	2346-236	0.1	55.1	±	7.7	***
Total		100.0	84.8	±	9.9	***

SD: standard deviation. Significant differences in the residual mol% of each PCB congener were examined by an Aspin–Welch test. The symbols *, ** and *** denote A significant difference at < 5%, < 1% and < 0.1%, respectively.

2.3.3 水田土壌から得られた PCB 分解微生物群集の群集構造解析

56 日培養後の PS 培養物における呼吸鎖キノン解析では、メナキノン-6 と-7 のみ増加がみられ、それ以外のキノン種は、検出されなかった (0.02 nmol/culture)。培養開始前の PS 培地において、キノン種は検出されなかったことから、本 PS 培養物中の微生物群集は、主にメナキノン-6 と-7 を含む嫌気微生物種が優占化していることがわかった。メナキノン-6 と-7 は、分類学上 *Deltaproteobacteria* 綱、*Epsironproteobacteria* 綱及び *Firmicutes* 門に分類される (Katayama and Fujie, 2000)。

また、同微生物群集構造は、*Bacteria* をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子の部分配列における PCR-DGGE 法でも解析した。Fig. 2-1 は、同 PS 養物の DGGE バンドパターンを示している。バンド番号 1、5、8、9 は、13 回の継代培養物間で安定的に強いバンドとして検出された。この DGGE バンドについて 16S rRNA 遺伝子のクローニングによる系統学的解析を行った(Table 2-5)。9 本の DGGE バンドのうちの 6 本は、*Firmicutes* 門の *Clostridia* 綱に分類され、この他のバンドは、*Bacteroidetes* 綱、*Deltaproteobacteria* 綱および *Chloroflexi* 門に分類された。この結果から、培養物中での *Firmicutes* 門の微生物種の集積が示唆された。これは、キノン解析で得られたメナキノン-6,-7 を含む Firmicutes 門の高集積結果とも一致した。

また、本培養物について、PCR による特異的検出法において、既知の 3 種の脱塩素化菌 *Dehalococcoides* 属や *Dehalobacter* 属、*Desulfitobacterium* 属の検出を試みた(Table 2-6)。その結果、*Dehalococcoides* 属近縁菌は検出されなかった。また、*Dehalobacter* 属近縁菌も最初の 3 継代までは検出されたが、その後検出されなくなった。一方、*Desulfitobacterium* 属近縁菌は、比較的高頻度に検出された。
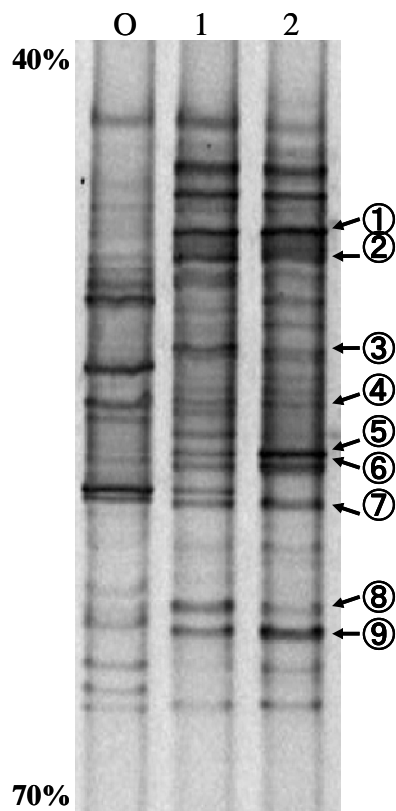
Fig. 2-1 PCR-DGGE profiles of cultures during serial transfers.

Lanes 1 and 2 are the duplicated results of the consortium that developed after 13 serial transfers of the anaerobic PCB-degrading culture obtained from Kuridashi paddy soil. Lane O indicates the original paddy soil. The percentages on the left-hand side of the figure indicate the gradient percentage of the denaturant in this gel.

The bands numbered in circles were sequenced. The phylogenetic analysis of these bands is shown in Table 2-5.

Table 2-5 Phylogenetic analysis of DGGE bands obtained from a Kuridashi paddy soil culture that developed after 13 serial transfers of the anaerobic PCB-degrading culture.

Band*	Phylum/class	Closest relative	Accession No.	Similarity (%)
1	*Firmicutes*	Uncultured bacterial clone Z39, from Hudson river PCB dechlorination sediment.	AY754833	97
2	*Firmicutes*	Uncultured *Clostridium* sp. clone AC036	AY330126	100
3	*Firmicutes*	Uncultured *Clostridiales* bacterium	AB100470	95
4	*Firmicutes*	Uncultured bacterial clone An7	AY826218	99
5	*Firmicutes*	Uncultured bacterium	AJ229190	95
6	*Firmicutes*	*Clostridium putrefaciens* strain MH47	AJ318906	93
7	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterial clone TSAa22, from polychlorinated dioxin-dechlorinating community	AB186816	99
8	*Delta-proteobacteria*	Uncultured bacterium closely related to *Desulfovibrio desulfuricans* G20	AY827462	96
9	*Chloroflexi*	Uncultured *Chloroflexi* bacterial clone AKYG643	AY921709	99

* The band numbers correspond to those shown in circles in Fig. 2-1.

Table 2-6 The frequency of detection of dechlorinating-bacteria by specific PCR in Kuridashi paddy soil cultures during 13 serial transfers.

Dechlorinating bacteria	Frequency of detection
Dehalococcoides spp.	0/13
Dehalobacter spp.	3/13
Desulfitobacterium spp.	10/13

2.4 考察

本章は、非汚染水田土壌中の微生物群集による市販品の KC-300/400 PCB 混合物の嫌気分解活性を示した初めての研究である。6 ヶ月培養した操出水田土壌を含む全培養条件の培養物だけでなく、4 ヶ月培養した弥富、長久手水田土壌を含む培養物においても、PCB 混合物の減少がみられた。PCB の減少量は約 20%しかなかったが、コントロール培養物と比較して統計学的に有意な減少であり、その再現性も得られた。これは、本培養物における PCB 混合物の減少が、嫌気的微生物分解によるものであることを示している。PCB 嫌気分解活性を確かめるために、PCB の脱塩素化に必要な電子供与体もしくは、酸化分解に必要な電子供与体を試験したが、これらの影響は、PCB 分解活性と相関が得られなかった。これは、PCB 混合物分解活性に必要な電子供与体や電子受容体は、水田土壌から供給されていることを示唆し

ている。これまで、嫌気性微生物による PCB の分解は、底質土や堆積物中で報告されてきた (Tiedje et al., 1993, Borja et al., 2005, Wiegel and Wu, 2000)。しかしながら、水田土壌における嫌気的 PCB 分解活性を明示した例はない。水田土壌は、実環境中では常に嫌気状態に保たれているわけではないが、この分解活性は、水田土壌を 6 ヶ月以上嫌気的培養することで獲得された。当研究室では、この水田土壌を使った、PCP(Pentachlorophenol)の脱塩素化および嫌気分解活性(Yoshida et al., submitted)、Fthalide の脱塩素活性(Yoshida et al., unpublished)やフェノール類の嫌気分解活性(Shibata et al., 2006)、またナフタレンやビフェニルの嫌気分解活性 (Yang et al., unpublished)も確認している。このことから、PCB 汚染履歴のない非汚染水田土壌は、各種芳香族有機塩素化合物だけでなく、分解困難な幅広い PCB 混合物に対する分解能を持った嫌気性微生物を含んでいることが示唆された。本研究では、強グライ土の操出土壌、弥富土壌と、黒ボク土の長久手における嫌気的 PCB 分解活性は示したが、灰色底質土、黄色底質土では試験していない。

本実験で試験した PCB 濃度は、初期水田土壌培養物では、実際の汚染土壌中の PCB 濃度の約 10 倍とした(1000 μg/100ml-culture)。これは、幅広い PCB 同族体に対する分解能を検索し、その分解能の集積を試みるためであった。一方、継代 PS 培養物に供試した PCB 濃度(100 μg/15 ml-culture)は、その 10 分の 1 で、実際の汚染土壌中の PCB 濃度とほぼ近い値としたが、これは低濃度汚染現場を想定した分解活性の獲得を目的としたためである。

本実験で採用した PCB 抽出方法は、キノン抽出方法を併用した方法である。PCB 分析の現行の公定法としては、昭和 46 年環境省告示第五十九号付表 3 で定められた方法と、日本工業規格(JIS)K0093 に定められた方法の 2 種類があり、いずれも溶媒抽出による GC 分析法である。一般に、PCB 抽出法は、アルカリ/エタノール抽出法、アセトン/ヘキサン抽出法を採用する例が多いが、これらの方法と本クロロホルム/メタノール抽出法では、回収率に違いがみられなかったことから、PCB-キノン併用抽出法を採用した。本抽出方法では、有機溶媒、超音波による細胞破壊抽出を行うことから、たとえ PCB が微生物菌体に吸着された場合でも、その回収率は高いはずである。

操出水田土壌由来の PCB 混合物分解活性は、AL 培地を添加した PS 培地において、接種率 5%、56 日間隔の継代培養によって 3 年以上の長期維持に成功した。分解活性の継代維持は、その微生物群集の接種源とした元のサンプルの培養条件を再現することが確実であると考え、土壌懸濁液をそのまま接種する方法を採用した。土壌懸濁液接種法は、その活性が土壌における微生物群集の生態系構築に起因している場合や、活性維持に土壌などの微生物の棲み場所が必要である場合に用いられる方法である。また、接種率と継代間隔は、より詳細な条件設定も可能であったが、微生物群集の特性評価と本微生物群集が分解できる PCB 同族体の範囲を評価することが主目的であったため、この継代条件設定で十分であると判断した。

本微生物群集は、KC-300/400 に含まれる PCB 同族体の多くを分解する能力を有した。特に、一部の低塩素化同族体について、培養前と比べた培養後の PCB 残留率に減少傾向がみられず、増加する傾向がみられた。これは、過去の底質土中にみられた脱塩素現象と同様の低

塩素化同族体の蓄積であると考えられる(Wiegel and Wu, 2000)。Hudson River や Silver Lakes における底質土中では、*meta*-、*para*-塩素化 PCB の減少が報告された(Brown et al., 1987)。Baltimore Habor から得られた河口底質土中では、*ortho*-塩素化 PCB の脱塩素活性が報告された(Berkaw et al, 1996)。Woods Pond の底質土を用いた各種培養条件では、*meta*-、*para*-塩素化 PCB だけでなく、*ortho*-塩素化 PCB も分解が確認された(Wu, et al., 1997)。一方、本培養物は、他の底質土や堆積物中で示されたような偏った嫌気分解活性とは異なり、*meta*-、*para*-塩素化 PCB だけでなく、*ortho*-塩素化 PCB の分解も見られた。このことから、本 PCB 混合物分解活性は、特異性も少なく、幅広い PCB 同族体に対して有効であることが期待された。

操出水田土壌培養物中の PCB 混合物の嫌気分解活性は、メタン生成とは相関が得られなかった。このことから、メタン生成古細菌は、PCB 分解活性には直接関与していないことが考えられた。3 年以上継代維持された PS 培養物中の微生物群集構造について、PCR-DGGE 法による 16S rRNA 遺伝子断片のクローニング解析と呼吸鎖キノン解析を行ったところ、*Firmicutes* 門(*Clostridia* 綱)の微生物種の優占化が確認された。また、PCR による特異的検出結果から、*Firmicutes* 門に分類される *Desulfitobacterium* 属近縁菌が高頻度に検出された。*Desulfitobacterium* 属菌は、水酸化 PCB 同族体である 3,3’,5,5’-tetrachloro-4-4’ biphenyldiol の脱塩素化菌を含むことが報告されている(Wiegel et al., 1999, Krasotkina et al., 2001)。*Chloroflexi* 門に分類される *Dehalococcoides* 属近縁菌は、既知の PCB 脱塩素化菌を含んでいるが、本 PS 培養物中では検出されなかった(Fennell et al., 2004)。これらの結果から、本培養物中でみられた嫌気的 PCB 分解活性には、微生物群集中の *Firmicutes* 門の集積が重要であるが示唆された。

第 3 章　PCB 混合物に対する嫌気分解活性の向上と特性評価およびその資材化

3.1 概要

第 2 章で、水田土壌培地における継代培養により、PCB 混合物の嫌気分解活性の長期維持に成功した。しかしながら、水田土壌培地で得られた 56 日培養における全 PCB 混合物分解率は約 14 mol%であり、分解活性としては大きくはなかった。そこで、本分解活性を向上させるために、培養条件を検討した。

水田土壌培養物では、水田土壌のもつ緩衝能によって培養期間、温度、pH、酸化還元電位、電子供与体等の化学的な培養条件変化による分解活性の向上はみられなかった。そこで、水田土壌を 550°C で 24 時間焼成した焼成土培地を用いたところ、水田土壌培養物と比較して約 2.5 倍の分解量 39.7 mol%(PCB 残留量 60.3 mol%)を獲得した。しかし、風乾土培養物や粉砕土では、水田土壌培養物(PCB 残留量約 87 mol% (56 日培養))との分解活性の有意差はみられなかった。焼成土培養物では、水田土壌培養物同様に幅広い PCB 同族体に対して分解活性がみられ、高塩素化物の減少に伴う低塩素化物の蓄積もあまり見られなかった。この高分解活性は、他の 2 種類の土壌(鎌島、長久手)を用いた焼成土培地でも、同様の傾向が確認できた。これらの結果から、焼成土培地が分解活性向上にとって有利な培地であることが示された。

焼成土培養物における PCB 分解活性、酢酸塩・乳酸塩および硫酸塩の消費と、微生物増殖について、196 日までの長期経時変化を調べたところ、それぞれ相関が得られた。そこで酢酸塩・乳酸塩を電子供与体と考えたところ、本微生物群集の PCB 脱塩素化効率は、93.9 nmol-Cl/mmol-e-donors と計算された。この結果から、現在培養系に添加している PCB 混合物を完全分解するには、理論上 8 mmol の電子供与体(酢酸塩・乳酸塩)の添加が必要であることが推測された。また本 PCB 分解活性は、56 日培養以降、電子供与体および炭素源が枯渇し、微生物増殖も見られず、PCB 分解活性も見かけ上弱まった。電子供与体および炭素源となる酢酸塩・乳酸塩を再添加したところ、196 日培養で 49.1 mol%の全 PCB 混合物を分解した。また、培地中に含まれる硫酸イオンの消費速度と、PCB 混合物分解速度から、硫酸還元菌の分解活性への関与が示唆された。硫酸塩を含まない培地(SF 培地；後述)における同分解活性試験結果では、酢酸塩・乳酸塩の再添加によって 56.5 mol%の全 PCB 混合物を分解できた。

本焼成土培養物の特性評価をするために、微生物阻害剤添加培養を行った。硫酸還元菌阻害剤であるモリブデン酸を添加した場合、培養後の PCB 同族体の残留割合が有意に変化した。一方で、培養物中ではメタン生成が確認されるにも関わらず、メタン生成菌阻害剤添加による影響は顕著ではなかった。このことから、メタン生成菌は、脱塩素活性に直接関与していないことが示唆された。

焼成土培養物における微生物群集は、水田培養物中の微生物群集構造とは異なっていたが、*Firmicutes* 門の微生物種の優先化がみられた。*Bacteria* をターゲットとした PCR-DGGE 法による群集構造解析結果では、阻害剤添加培養物におけるバンドパターンに変化がみられたが、

Archaea をターゲットとした DGGE では、バンドパターンに変化がみられなかった。この群集構造の変化が、PCB 分解活性を維持・促進していることが推定された。また、モリブデン酸阻害剤添加実験により、硫酸還元細菌の脱塩素活性への影響が強く裏付けられた。一方、PCR による既知の脱塩素化菌の検出と、分解活性の相関は得られなかった。

本研究では、PCB 混合物分解微生物バリヤーの開発を最終目標としているため、本分解活性の資材化を検討した。現段階では、本研究で獲得された分解活性は、そのポテンシャルとリスクが未知数であるために現地への直接実汚染環境施用は難しいが、実資材を模擬した微生物包埋用の担持資材を用いて、PCB 分解能を評価した。

3.2　実験方法

3.2.1 PCB

PCB は、第 2 章で使用したものと同一の PCB 混合物を使用した。KC-300 と KC-400 (Kanegafuhi Chemical Industry, Osaka, Japan)を 1：1 で混合した PCB 混合物を、1 g/l のアセトン溶液として調製した。PCB 混合物は、2 塩素化から 7 塩素化物まで 50 種以上の異なる同族体を含み、主に 3 塩素化物(39.9% (w/w)) と 4 塩素化物(44.4% (w/w))からなる。

3.2.2 土壌処理

本実験では、操出土壌(gley lowland soil; FAO/UNESCO classification: Eutric Fluvisol)、鎌島土壌(gray lowland soil; Eutric, Gleysols)及び長久手土壌(ando soil; Haplic Andosol)の 3 種の土壌を耕作層から採取した(いずれも愛知県内)。土壌特性は柴田ら(2006)が報告している。いずれの土壌からも PCB は検出されなかった。この水田土壌(以下 PS と略する)は、2 mm の篩を通した後、暗条件、湛水状態で保存した。

本実験では、土壌自体を改変しその影響を評価した。乾燥 PS(Dried PS；以下 DPS と略す)は、PS を風乾したものとした。粉砕 PS(Ground PS；以下 GPS と略す)は、PS を乳鉢ですりつぶし、0.5 mm の篩を通したものとした。焼成土(Burnt soil；以下 BS と略す)は、PS の有機物が完全に参加されるように 550°C で 24 時間焼成したものとした。粉砕 BS は、BS を乳鉢ですりつぶし、0.5 mm の篩を通したものとした。3 種土壌の BS と操出土壌の PS について、その化学的性質を Table 3-2 に示した。

3.2.3 PCB 分解微生物群集

本章では、第 2 章で構築した操出水田土壌から獲得した PCB 混合物分解微生物群集を、微生物源として用いた。この微生物群集は、使用するまで 56 日間隔 5%継代によって、維持してきた。実験方法や培地組成の詳細は、前章で述べたとおりである。

異なる土壌培地における嫌気的 PCB 分解活性の試験するために、PS、DPS、GPS、BS、

GBS はそれぞれ連続 3 日間オートクレーブ処理(121°C、30 min)を施した。培養は、100 ml のガラスバイアルを用い、PS 懸濁液 4 ml(PS 3.5 g (dry weight))もしくは、4 g の DPS、GPS、BS、GBS を別々に準備した。ここへ、嫌気性チャンバー内で(Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI)1 g/l の PCB 混合液 100 µl をアセトン溶液として添加し、AL 培地 15 ml を添加した。バイアルの気相は、100%窒素ガスで飽和し、テフロンライナー付きブチルゴム栓で密封した。この PS を含む AL 培地添加物を PS 培地、同 DPS を含むものを DPS 培地、以下同様にそれぞれ GPS 培地、BS 培地、GBS 培地と定義する。

PCB 分解微生物群集は、各新培地への 5% (v/v)継代接種を行い、暗条件 30°C で静置培養した。56 日培養後、PCB 残留率は、殺菌コントロール培養物中の PCB 残留率と比較した。土壌処理の影響は、操出 PS 培養物中の PCB 分解活性と比較した。

硫酸塩の分解活性への阻害効果を比較するために、培地成分に硫酸塩を含まない Sulfate-free(SF)培地を使用した。SF 培地の組成は、吉田により設計された(/l)；NaCl 1 g, KCl 0.5 g, NH_4Cl 0.5 g, $CaCl·2H_2O$ 0.1 g, $MgCl_2·6H_2O$ 0.1 g, yeast extract 0.1 g, trace elements SL-10 1 ml, Se/W solution 1 ml, Resazurin solution 1 ml, FeS solution 1 ml, 200 mM MOPS solution 100 ml (pH 7 by KOH)； Trace element SL-10 (/l)；HCl (25%) 10 ml, $FeCl_3·4H_2O$ 1.5 g, $ZnCl_2$ 0.07 g, $MnCl_2·4H_2O$ 0.1 g, H_3BO_3 6 mg, $CoCl_2·4H_2O$ 0.19 g, $CuCl_2·2H_2O$ 2 mg, $NiCl_2·6H_2O$ 0.024 g, $Na_2MoO_4·2H_2O$ 0.036 g。Se/W solution (/l)；NaOH 0.5 g, $NaSeO_3·5H_2O$ 3 mg, $Na_2WO_4·2H_2O$ 4 mg。この SF 培地を添加した焼成土培地および焼成土培養物は、それぞれ SF-BS 培地、SF-BS 培養物と呼ぶことにする。

全実験は、2 連もしくは 3 連で行った。殺菌コントロール培養物は、121°C、30 分のオートクレーブ処理後、0.1%のパラホルムアルデヒドを添加し同条件で培養した。

3.2.4 PS 培地における培養条件の比較

PS 培養物における PCB 分解活性について、下記の培養条件を変化した。継代作業環境(クリーンベンチ内窒素ガス流入環境(微好気)、不流入環境(好気))、熱処理(PS 培養物作成直後 100 °C, 10 min)、微生物生育阻害剤(硫酸還元菌生育阻害剤；2 mM モリブデン酸(Taylor and Oremland, 1979)、メタン生成菌阻害剤；2 mM 2-bromoethane sulfonic acid (BES) (Gunsalus et al., 1978))、AL 培地 pH(AL 培地の pH7 調整時に pH5 と pH9 にした AL 培地)、培養温度(4°C, 22°C)、振とう培養(100 rpm/min)、酸化還元電位制御(2.5% システイン塩酸塩、モリブデン酸ナトリウム、硫化ナトリウムを AL 培地に添加)。改変項目以外の条件は、通常 PS 培地と同一とし、培養方法や分析方法も同じ方法を用いた。PCB 分解活性は、通常 PS 培養物と比較した。

3.2.5 PCB 分解活性促進方法

分解活性への電子供与体および炭素源の再添加による影響を評価するために、1 mmol の酢酸塩・乳酸塩を BS 培養物および SF-BS 培養物に添加した。酢酸塩・乳酸塩の再添加は、操出 BS 培養物に対して 14 日、28 日、56 日、112 日目に添加し、196 日まで行った。

3.2.6 阻害剤の影響

実験結果から、BS 培養物における PCB 分解活性には、メタン生成菌と硫酸還元菌の関与が示唆された。そこで、これらに対する阻害剤添加による PCB 分解活性への影響を試験するために、硫酸還元菌生育阻害剤であるモリブデン酸および、メタン生成菌阻害剤である 2-bromoethane sulfonic acid (BES)を、それぞれ 2 mM ずつ別々に操出 BS 培地に添加した。56 日培養後、分解活性への影響を、阻害剤非添加の操出 BS 培養物の結果と比較した。

3.2.7 微生物資材の検討

現場施用を想定した微生物資材の開発の基礎知見を得るために、3 種類の資材を供試した。鉄なし鶏糞炭ペレット(以下 NIWA-1 と呼ぶ)、鉄粉 50%含有鶏糞炭ペレット(以下 NIWA-3 と呼ぶ)および鶏糞炭混錬空気焼成ペレット(lot No.F050823；以下 TYK-1 と呼ぶ)の 3 種ペレットは、TYK(株)により作成・提供された。

サンプルは、嫌気性チャンバー内で AL 培地 15 ml および PCB 混合物(100 μg-total PCB mixutre)を添加し、あらかじめ窒素爆気により気孔内部まで嫌気気相置換を行った各種ペレットを添加後、100%窒素ガスで飽和し、テフロンライナー付きブチルゴム栓で密封した。各培地におけるペレット添加量は、NIWA-1 および NIWA-3 は、全長約 3 cm のペレットを一粒加え、TYK-1 は、乾燥重量で 4g を加えた。PCB 分解微生物接種源は、操出水田土壌培養物とし、5% (v/v)接種後、暗条件 30°C で静置培養した。NIWA-1 は、空隙サイズの違いによる微生物吸着能試験の視認試験に供した。NIWA-3 は、PCB 混合物の分解能と吸着能を試験するために、嫌気性チャンバー内でペレットのみをつまみ出し、AL 培地および PCB 混合物を添加した新しい培地へ投入することで継代培養を行った。TYK-1 は、継代培養は行わなかったが、PCB 混合物の分解能と吸着能を評価した。56 日培養後のサンプル中の PCB 残留量は、殺菌処理を施した同コントロール培養物中の PCB 残留率と比較した。

3.2.8 PCB 残留物の抽出と検出

PCB 残留物の検出は、前章でその詳細を述べたので、ここでは、説明を簡略化する。

培養後のサンプルは、クロロホルム/メタノール(2:1)混合溶媒で抽出した。有機溶媒層に溶出した PCB 画分は、*n*-ヘキサンを用いて濃縮し、シリカゲルカラムと不活性化したフロリジルカラムを用いて精製した。精製した PCB 画分は、HT8 キャピラリーカラム(0.22 mm ID, 50 m L, 0.25 μm FT; SEG, Austin, TX)を接続した GC/ECD (^{63}Ni ECD 付き GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan)で分析した。データ採取と解析は、Shimadzu Class GC Station (Shimadzu, Kyoto, Japan)で行い、各 PCB 同族体量は、培養サンプル中あたりの重量換算を行った。KC-300/400 混合物 100 μg 中の各 PCB 同族体の検出限界は、35.7 ng であった。全 42 種の PCB 同族体が検出された。IUPAC 番号(以下#で示す) 56 と#60 に関しては、培養物からの抽出物が妨害ピークとなって検出できない場合があったため、定量値から除外した。また、指標 PCB 同族体のうち#153 と#180 の 2 種は、それぞれ検出限界未満であったために除外した。一方、本実験

結果では、培養開始前は検出限界未満であった PCB 同族体#15 と#25 の蓄積が見られることがあった。そのため、第 2 章で検出した全 42 種の PCB 同族体に、この 2 種を加えた 44 種を検出対象とした。この結果検出された PCB 同族体の総和は、Kim らによって報告された市販品 KC-300 と-400 の混合物の総和に対する 83.0% (w/w)に相当した。この方法による PCB 混合物 100 µg の添加回収率は、92.9%±5.5% (w/w)で、各同族体別では 93.6%以上の回収率が得られた。

PCB 分解活性は、培養物中の全 PCB 残留量および各同族体別の残留量について、殺菌コントロール培養物中の各 PCB 残留量を比較することで評価した。全 PCB 残留率における分解活性の有意性は、Bonferroni 多変量解析に基づく有意差検定(F-test)によって評価した。また、各同族体の有意な分解活性は、Aspin-Welch 検定で評価した。

脱塩素化率は、全塩素原子の減少率から求めた。また、脱塩素化効率は、添加した PCB 混合物の減少量から計算された塩素原子の脱塩素化モル量(nmol-Cl)と培養物中の酢酸塩と乳酸塩を電子供与体とした場合のその消費モル量(mmol-e-donors)から算出した。

3.2.9 培養物中の有機酸の測定

培養物中の有機酸するために、培養物を 1 ml 程度採取し、0.45 µm メンブレンフィルターを通して 100 倍希釈した溶液を調製した。この溶液 20 µl を L-column ODS (4.6 mm ID, 250 mm L; CERI, Saitama, Japan)を接続したフォトダイオードアレイ検出器付 HPLC(CTO-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)で測定した。標品の検出時間と検量線面積から、その量を換算し求めた。

培養物の気相中に含まれるメタンは、第 2 章で述べた方法で GC/FID を用いて検出した。気相中の二酸化炭素および水素は、熱伝導検出器(thermal conductivity detector; TCD)付き GC (GC-14B, shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて分析した。接続した SUS カラムは、二酸化炭素用に Packed column J Active carbon 60/80 (3 mm ID, 2 m L, GL Science, Tokyo, Japan)、水素用に Packed column J Molecular sieve 5A 60/80 (3 mm ID, 3 m L, GL Science, Tokyo, Japan)とした。インジェクター及び検出器温度はいずれのガス分析時も 150°C とし、カラム温度は、二酸化炭素検出時は 80°C、水素検出時は 50°C とした。気相 100 µl 中の検出限界濃度はいずれも 0.1 mol%であった。

3.2.10 キノン解析

呼吸鎖キノンは、PCB 抽出と同時にクロロホルム/メタノール(2:1)によって抽出した。キノン画分は、シリカゲルカラムによって分画溶出され、精製後、HPLC により分析した。詳細は第 2 章で述べた。

3.2.11 総菌数測定

PBSE 緩衝液(130 mM NaCl, 10 mM リン酸バッファー, 1 mM EDTA, pH7.0)を調製し、2 枚重

ねした 0.2 μm メンブレンフィルターでフィルター滅菌した。この緩衝液を用いてサンプル 1 ml に対して全 10 ml 容量で希釈系列を作成した(10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5})。この希釈液を、エチジウムブロミド染色(100 μg/ml を 100 μl)し、ブラックメンブレンフィルターを設置した吸引ろ過器上に全量投入し、吸引捕集した。捕集後のブラックメンブレンフィルターは、ろ紙上で暗所乾燥させた。このフィルターをスライドガラスに載せ、90%グリセロール PBS 溶液(PBSE 溶液組成から EDTA を除き、グリセロールを加えたもの)1 滴をたらし、菌を固定しカバーガラスをつけてから、顕微鏡観察した。バックグラウンド補正をするために、サンプルなしで一連の操作を行ったものも準備した。顕微鏡観察は、1 視野に 50 以上の細胞が確認できる希釈段階を用い、ランダムに 10 視野観察・計測し、視野面積、倍率、希釈段階を加味した換算を行い、その平均値を求めた。この方法は、Roser(1978)の方法を基本に染谷ら(1995)が行った方法を改良したものである。

3.2.12 DNA 抽出および PCR-DGGE 解析

培養物中のゲノム DNA は、ISOIL extraction kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。微生物群集 DNA について、PCR による 16S rRNA の部分配列増幅を行い、DGGE 解析を行った。*Bacteria* をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子断片増幅は、プライマーセット 341F/518R (Muyzer et al., 1993)で行い、*Archaea* をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子断片増幅は、プライマーセット 344F/518R (Casamayor et al., 2002)で行った。PCR 条件、及び DGGE 条件は、第 2 章で述べた通りである。

微生物群集構造の系統学的解析は、pTBlue Perfectly Blunt Cloning Kits (Novagen, Madison, WI, USA)を用いて PCR 産物に関するランダムクローニングによって行った。16S rRNA 遺伝子断片クローンは、DNA シーケンサー (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)を用いて遺伝子配列確認を行った。DNA 配列は、GENETYX program (Version 7, Software Development Co., Tokyo, Japan)を用いて解析し、 NCBI-BLAST データベースに基づき、最近縁種を検索した。遺伝子配列は、AB282539 to AB282545 の登録番号で DDBJ に登録した。

3.2.13 脱塩素化菌の検出

既知の脱塩素化微生物の特異的検出は、16S rRNA 遺伝子配列の PCR 増幅によって行った。*Dehalococcoides* 属近縁菌検出用プライマーセット(793F/946R)は吉田ら(2005)により設計されたもの、 *Dehalobacter* 属近縁菌検プライマーセット (441F/645R)および *Desulfitobacterium* 属近縁菌検出プライマーセット(406F/619R)は、Smits ら(2004)によって設計されたもの、また *Dehalococcoides* 属近縁菌および *o*-17/DF-1 を含む *Chloroflexi* 門検出プライマーセット(348F/884R)は、Fagervold ら(2006)によって設計されたものを、それぞれ使用した。プライマー配列および PCR 条件は、第 2 章で述べた。

3.3 結果

3.3.1 培養条件の検討

第 2 章で獲得した PS 培養物において、継代環境、熱処理、阻害剤、pH、温度、振とう培養、酸化還元電位の各条件を試験したが、PS 培養物と比較して有意な結果は得られなかった (Table 3-1)。このことから、水田土壌を含む培地では、PCB 分解活性を向上することができなかった。

Table 3-1 Effects of incubation conditions on the total residual PCBsin Kuridashi paddy soil cultures

Conditions		Residual amount (mol%)	±	SD
Preparation condition	Aerobic[a]	90.9	±	0.0
	Microaerobic[a]	91.0	±	0.0
Heat treatment	100 °C, 10min.	90.4	±	8.0
Inhibitors	2 mM BES	88.5	±	7.6
	2 mM Molybdate	88.7	±	7.5
pH	pH 5	89.9	±	7.1
	pH 9	90.6	±	7.6
Temperature	4°C	93.5	±	4.4
	22°C	90.3	±	2.3
Shaking	100 rpm/min	90.6	±	3.0
Reducers	2.5% Cystein-HCl	90.9	±	12.3
	2.5% Thioglycorate	91.3	±	10.7
	2.5% Sodium sulfate	90.6	±	10.0

[a] Serial transfer was performed with and without nitrogen gas flow (microaerobic, aerobic) in the clean work station

3.3.2 BS 培地における PCB 分解活性の向上

Table 3-2 に、操出 PS と 3 種土壌の BS の化学的特性と、各培地における 56 日培養後の全 PCB 残留率を示した。殺菌コントロール培養物では、全 PCB 残留率は、98.9%±0.5% (w/w) であったことから、PS 培養物、BS 培養物の双方の PCB の減少が、微生物活性に起因していることが確認できた。本章における操出 PS 培養物は、第 2 章で述べた PS 培養物の継代培養物であるため、同等の PCB 分解活性を再現した。操出 PS 培養物中の全 PCB 残留率を、3 種の BS 培養物中のそれと比較すると、約 8% (w/w)の分解活性の向上が見られた。3 種の BS 培地は、その化学的特性が異なるにも関わらず、全 PCB 残留率には有意な違いはみられなかった。また、GBS 培養物における全 PCB 残留率は、76.3%±5.2% (w/w)で、他の BS 培養物と同等の活性化がみられた。一方、操出 PS を用いた DPS 及び GPS 培養物中の全 PCB 残留率は、それぞれ 88.4%±10.2% (w/w)と 91.2%±13.5% (w/w)であり、PS 培養物と比較した分解率の向上はみられなかった。

Table 3-2 Chemical properties of PS and three BSs, and the total PCB residues in the cultures containing PS and BSs as carriers after 56 days of incubation

	PS	BSs		
Properties	Kuridashi	Kuridashi	Kamashima	Nagakute
Total carbon (%)	1.0	ND	ND	ND
Exchangeable Mg (mg/kg-dry soil)[a]	0.63	29.6	76.1	3.3
Exchangeable Ca (mg/kg-dry soil)[a]	178.7	202.5	392.5	31.7
Exchangeable K (mg/kg-dry soil)[a]	2.4	110.0	145.0	25.1
Exchangeable Na (mg/kg-dry soil)[a]	55.5	29.5	50.5	18.9
Cl^- (mg/kg-dry soil)[b]	36.8	4.0	9.0	6.0
SO_4^{2-} (mg/kg-dry soil)[b]	92.1	36.2	216.2	60.3
pH (H_2O)[b]	6.7	6.3	6.4	6.2
Electric conductivity (μS/cm)[b]	50.1	37.0	63.7	21.5
Oxidation reduction potential (mV)[b]	-179	79	67	92
Total residual PCBs % (w/w)[c]	85.6±8.6	77.6±9.4*	78.0±9.1*	77.5±7.2*

PS: paddy soil, BS: burnt soil, ND: less than detection limit (0.01%). [a] The exchangeable cations were evaluated by acetate-ammonium extraction. [b] Analysis condition; soil : water = 10 g (dry-weight) : 125 ml at 25°C. [c] Total PCB residues in individual cultures containing PS or BS are shown as percentage (w/w) of the sterile control. The values are the averages of three times of incubation using five percent (v/v) of the cultures transfer with incubation intervals of 56 days. Significant differences in the total PCB residues in BS cultures were compared with PS culture by analysis of variance (F-test) followed by a Bonferroni multiple comparison test. The symbol * denote the significant differences at less than 5% of probability

操出 BS 培地を用いて促進された PCB 分解活性は、第 2 章で確立した方法と同様に、接種率 5%、56 日間隔で継代培養することによって、3 年以上にわたり、継代維持された。この条件で 15 回継代した操出 BS 培養物中の全 PCB 残留率の平均値は、殺菌コントロールと比較して 61.3%±15.9% (w/w) (60.3±16.1 mol%)であった(P< 0.01)。平均脱塩素化率は、36.5±15.4 mol%と算出された(P< 0.01)。

操出 BS 継代培養物における 56 日培養後の各 PCB 同族体別の残留率を、Table 3-3 に示した。KC-300/400 混合物に含まれる PCB 同族体の多くが、殺菌コントロール培養物と比較して減少していたことから、微生物分解による幅広い PCB 分解活性を有していることが示唆された。PCB 同族体#41、#72/#64、#136、#176 は、継代培養間での残留率のばらつきが大きく統計学的有意差は得られなかった。微生物分解は、*meta*-および *para*-塩素化同族体だけでなく、*ortho*-塩素化同族体も分解した。しかも、#74、#149/#77 といった高塩素同族体の減少に伴った低塩素化同族体の蓄積もみられなかった。PS 培養物中では、#6、#17 及び#32 の蓄積傾向がみられていたが、操出 BS 培養物中では、#6、#8、#16 の値の触れ幅は大きかったが、低塩素化同族体の蓄積がみられなくなった。これらの結果は、操出 BS 培養物において、PS 培養物で得られた分解活性を飛躍的に向上したことを示しており、その結果、低塩素化同族体の蓄積が見られなくなったものと考えられる。

Table 3-3 Average residual amount of individual PCB congeners (mol%) in Kuridashi PS and BS cultures after 56 days of incubation during the maintenance of the anaerobic PCB-degrading activity over 15 times of the serial transfers.

IUPAC number	Substituted positions of Cl	mol % in initial PCB mixture	Kuridashi PS			Kuridashi BS			Significant difference
			Residual amount	±	SD	Residual amount	±	SD	
6	2-3	0.6	137.4	±	22.5	66.6	±	42.1	***
8	2-4	4.5	87.8	±	10.9	42.6	±	20.8	***
16	23-2	0.3	98.3	±	12.6	67.2	±	32.2	*
20/33/45	23-3/34-2/236-2	7.9	83.8	±	11.8	56.7	±	17.3	***
17	24-2	2.8	103.4	±	14.6	61.0	±	18.9	***
28/53	24-4/25-26	10.1	81.1	±	10.2	51.1	±	6.1	***
18	25-2	7.7	88.3	±	11.9	56.7	±	17.3	***
26/50	25-3/246-2	9.6	84.4	±	11.2	52.9	±	17.1	***
31	25-4	9.6	84.4	±	11.2	52.9	±	17.1	***
32	26-4	2.0	97.6	±	11.4	63.9	±	19.8	***
44	23-25	6.1	88.3	±	14.0	64.1	±	15.5	***
46	23-26	3.2	92.8	±	17.6	61.9	±	19.2	**
49/43	24-25/235-2	4.2	84.6	±	10.3	63.6	±	18.7	**
66	24-34	5.8	82.1	±	10.6	62.4	±	14.4	***
52/69	25-25/246-3	6.6	87.2	±	10.3	72.9	±	19.9	*
70	25-34	7.0	84.9	±	10.8	54.4	±	12.1	***
72/64	25-35/236-4	3.4	83.2	±	10.0	74.5	±	22.6	
41	234-2	0.8	88.6	±	7.9	70.1	±	32.3	
74/95	245-4	3.9	83.4	±	10.6	63.3	±	15.5	***
110	236-34	2.6	86.9	±	11.5	68.6	±	14.9	**
105	234-34	1.2	87.5	±	11.7	68.3	±	22.1	**
97/117/86	245-23/2356-4/2345-2	1.1	81.4	±	14.6	67.9	±	17.0	*
101/150	245-25/236-246	3.1	82.7	±	9.4	64.3	±	26.5	*
118	245-34	1.9	78.1	±	11.6	68.5	±	8.8	*
103/71	246-25/26-34	1.2	87.2	±	12.0	71.0	±	22.4	*
138	234-245	0.3	88.6	±	17.3	70.9	±	11.0	**
136	236-236	0.2	73.0	±	19.4	81.6	±	25.6	
149/77	236-245/34-34	0.2	87.6	±	12.5	60.6	±	19.2	***
176	2346-236	0.2	77.8	±	15.0	63.9	±	24.0	
Total		100.0	85.5	±	8.6	60.3	±	16.1	***

Abbreviations; PS: paddy soil, BS: burnt soil, SD: standard deviation The residual amounts are expressed as mol% of the sterile control. The values are the averages after 56 days of incubation for 15 times of the serial transfers during the maintenance of the anaerobic PCB-degrading activity. Significant difference in the residual mol% of each PCB congener was compared between BS and PS cultures by an Aspin-Welch test. The symbols *, **, and *** denote the significant differences at less than 5%, 1% and 0.1% of probability, respectively.

3.3.3 酢酸塩・乳酸塩および硫酸塩の消費、微生物増殖と PCB 分解活性の関係

操出 BS 培養物における PCB 残留率の経時変化と、酢酸塩・乳酸塩および硫酸塩の消費量と微生物増殖曲線を Fig. 3-1 にまとめて示した。全 PCB 残留率の減少は、56 日まではみられたが、それ以降は速度が遅くなった(Fig. 3-1 (a))。BS 培地は、初期段階で 1.46 mmol の酢酸塩と 1.34 mmol の乳酸塩を電子供与体および炭素源として含んでいる。乳酸塩は、培養 7 日間でほぼ消費された。酢酸塩の一部も培養 7 日間で消費されたが、主に 7 日から 56 日の間に消費された。一方、培地中に 0.064 mmol 含まれていた硫酸塩は、培養 7 日目で完全に消費された。この硫酸塩消費は、特に乳酸塩の消費との相関が得られた。また、培養期間が経過するにつれ、硫酸塩還元によって生成する硫化水素イオンと鉄イオンから形成されたと考えられる硫化鉄様の黒色粒子の沈殿が観察された。微生物総菌数は、初期 7 日間で増加したが、その後 56 日まで緩慢な増殖が見られた(Fig. 3-1 (c))。全 PCB 残留率の減少速度について、7 日以降 56 日までに観察された速度に対し、培養初期 7 日間はあまり速くなかった。これらは、硫酸塩消費による PCB 分解活性の阻害が生じた可能性と、その後酢酸塩の消費と緩慢な微生物増殖に伴う PCB 分解が進行した可能性を示唆している。56 日以降 196 日までは、PCB 分解活性は見られなかった。このとき培地中の酢酸塩、乳酸塩は、既にほとんどが消費され、更なる微生物増殖も見られなかった。56 日培養後の培養物の気相中から、メタン、二酸化炭素および水素が、それぞれ 16.6 mol%、0.2 mol%、0.1 mol%検出された。培養物中の有機酸は、ピルビン酸とプロピオン酸が、0.018 mmol、0.010 mmol それぞれ検出された。これらの結果から、本 PCB 分解活性は、微生物増殖と相関があり、また酢酸塩が、PCB 混合物を分解するための電子供与体および炭素源となっていることが示唆された。また、培地中に含まれる硫酸塩による PCB 分解活性の阻害も示唆された。この操出 BS 培養物中の脱塩素化効率は、56 日培養で 93.9 nmol-Cl/mmol-e-donors であった。

3.3.4 酢酸塩・乳酸塩の再添加

BS 培養物における PCB 分解活性について、酢酸塩・乳酸塩の再添加による影響を、培養期間 196 日で評価した(Fig. 3-2)。通常の BS 培養物において、56 日以降の全 PCB 残留率は、見かけ上変化しなかったが、酢酸塩・乳酸塩を複数回再添加することによって、全 PCB 残留率の減少は 196 日までみられた。BS 培養物は、この再添加によって全 PCB 残留率の減少を約 10% (w/w)促進した。しかしながら、その PCB 分解速度は、初期 56 日間にみられたものよりも遅かった。
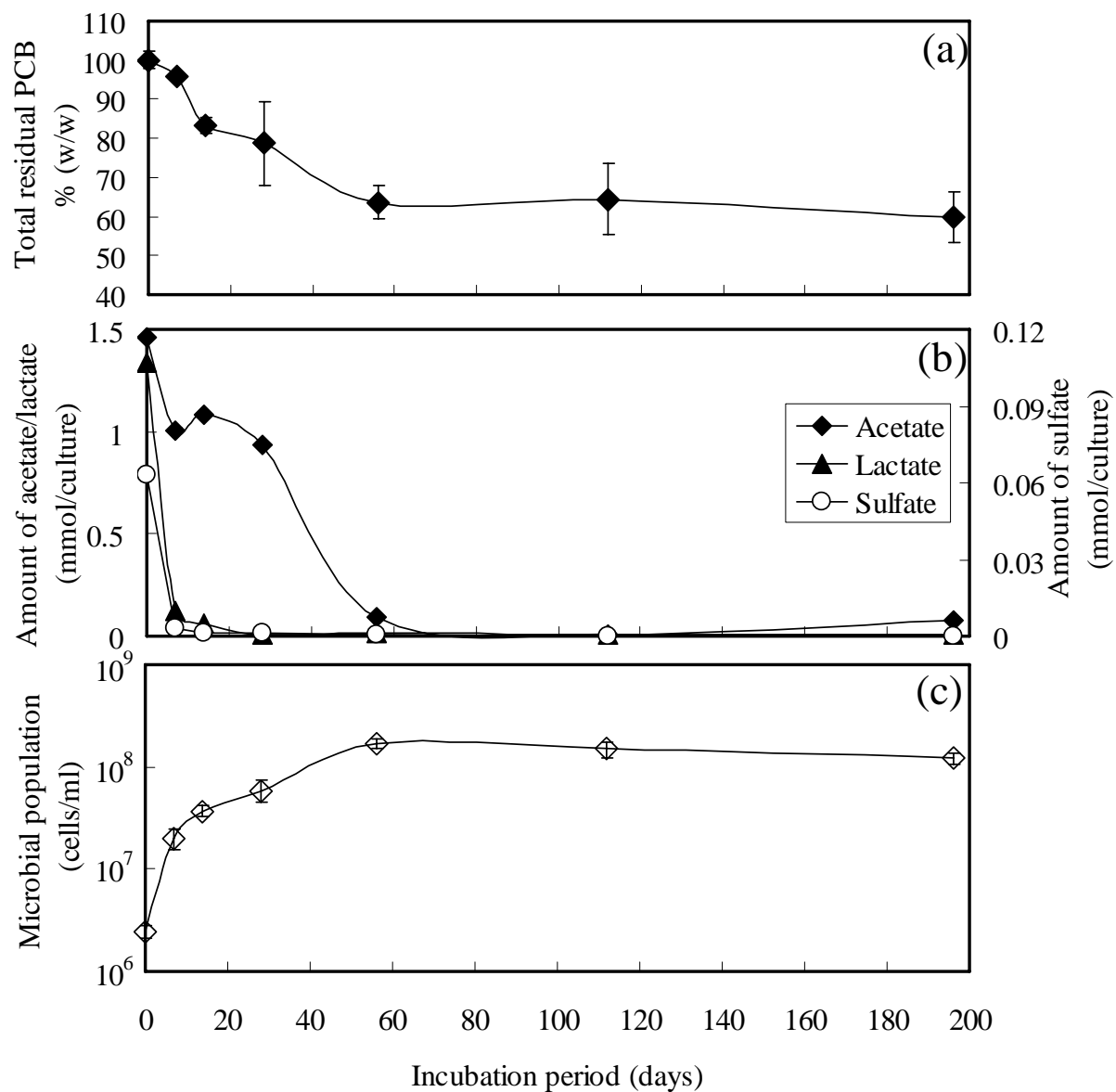
Fig. 3-1 Changes in the total amount of PCB residues (% (w/w)) (a), in the amounts of acetate, lactate and sulfate (mmol/15 ml-culture) (b), and in the microbial population (cells/ml) (c) in Kuridashi BS culture over 196 days of the incubation.
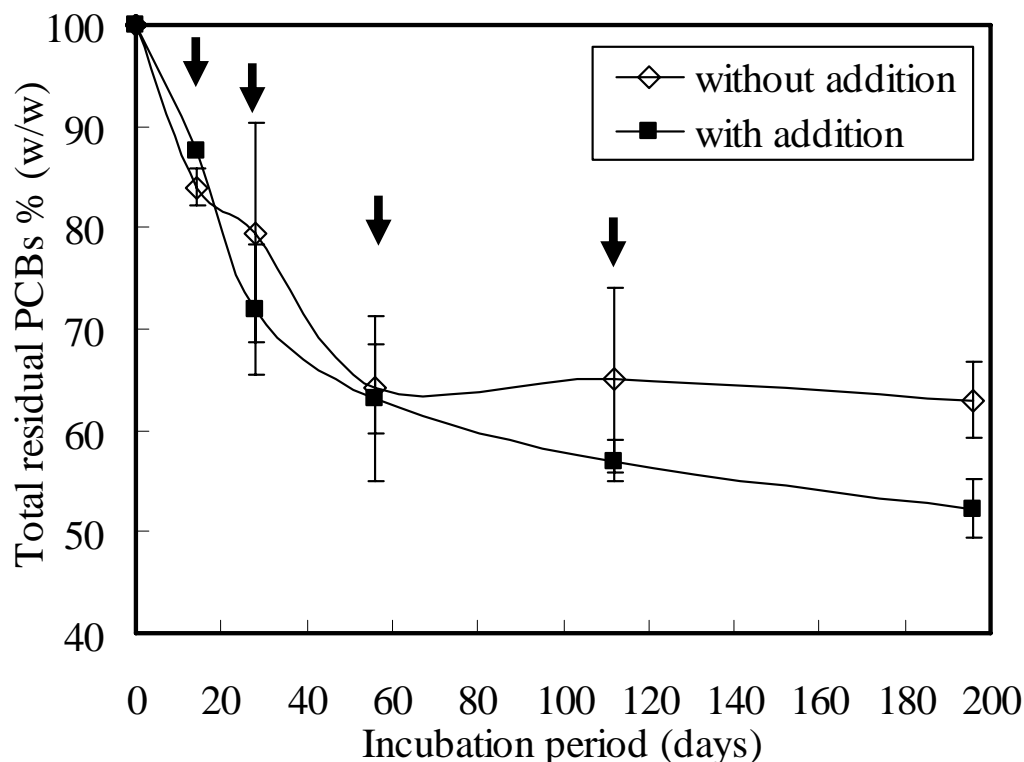
Fig. 3-2 Changes in the total amount of PCB residues (% (w/w)) in Kuridashi BS culture over 196 days of the incubation with or without additional acetate/lactate (electron donors) with appropriate intervals.

Arrows show the time that the electron donors were added into the culture. Vertical bars denote standard deviation.

3.3.5 硫酸塩非含有培地の効果

硫酸塩を含まない SF-BS 培養物において、196 日間の長期培養による PCB 分解活性の経時変化と、酢酸塩・乳酸塩再添加効果を行った(Fig. 3-3)。酢酸塩・乳酸塩を再添加しなかった SF-BS 培養物では、PCB 分解速度が 28 日以降急激に低下した。一方、再添加処理を施した SF-BS 培養物では、56 日までとそれ以降で分解速度に違いが見られたものの、培養 196 日目において全 PCB 残留率の減少傾向が見られた。また、196 日目の培養物中の有機酸および気相ガスを測定したところ、酢酸塩 0.14 mmol、乳酸塩 0.03 mmol、ピルビン酸 0.002 mmol、プロピオン酸 0.001 mmol、メタン 21 mol%、水素 0.2 mol %が検出された。二酸化炭素は検出限界未満であった。このときの全 PCB 残留率は、45.1%±2.8% (w/w) (43.5±2.8 mol%)であり、脱塩素化率は、54.9 mol%であった。このことから、硫酸塩を含まない SF 培地における酢酸塩・乳酸塩の再添加によって、BS 培養物における最高分解活性を獲得した。
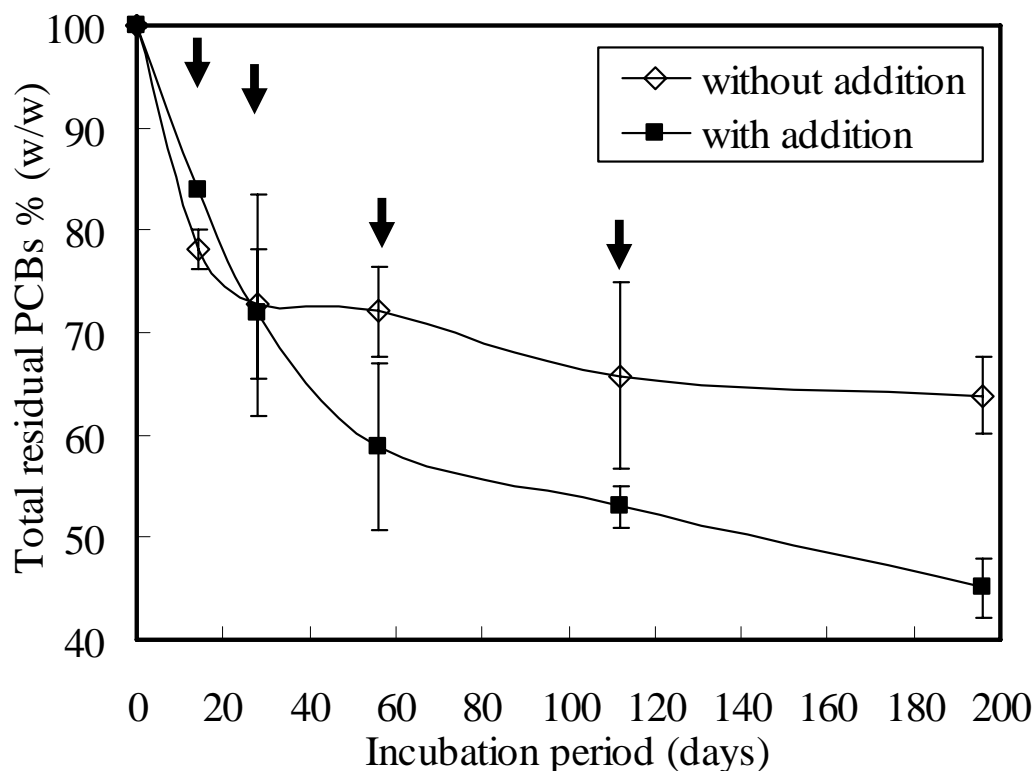
Fig. 3-3 Effects of sulfate-free medium on the total amount of PCB residues (% (w/w)) in Kuridashi BS culture over 196 days of the incubation with or without additional acetate/lactate (electron donors) with appropriate intervals.

Arrows show the time that the electron donors were added into the culture. Vertical bars denote standard deviation.

3.3.6 PCB 分解活性における阻害剤の影響

BS 培養物において、硫酸塩の消費やその含有培地によって、PCB 分解活性が影響を受けることが示唆されたことから、硫酸還元菌生育阻害剤であるモリブデン酸添加による影響を評価した。モリブデン酸を添加した BS 培養物中の全 PCB 残留率は 77.6±15.6 mol%であったが、阻害剤非添加の BS 培養物中の全 PCB 残留率は、65.6±4.6 mol%であった。両培養物中の脱塩素化率は、順に 25.3±1.4 mol%と 34.5±3.9 mol%であった。モリブデン酸添加培養物の気相中のメタン濃度は 17.3 mol%で、阻害剤非添加の BS 培養物中の値と同程度であった。幅広い PCB 同族体に対して分解活性が確認されたが、特に Table 3-4 に示した PCB 同族体のうち、#28/#53 (P< 0.01)、#44 (P< 0.01)では、BS 培養物と比較した有意な減少が見られた。低塩素同族体、特に#15(P< 0.01)と#25 (P< 0.05)についても BS 培養物と比較した有意な蓄積がみられた。これらの同族体は、培養開始前には検出限界未満であった(Fig. 3-4)。モリブデン酸非添加の BS 培養物中では、このような低塩素化同族体の蓄積はみられず、Fig. 3-4 で示した環境指標 PCB 同族体の減少と同様に、多くの PCB 同族体が分解した。

Table 3-4 Average residual mol percentage of each PCB congener in the BS culture amended with 2 mM of molybdate and BES after 56 days of the incubation.

IUPAC congener number	Substituted position of Cl	mol% in initial PCB mixture	BS	Molybdate		BES	
			Residual amount	Residual amount	D	Residual amount	D
6	2-3	0.6	65.8±10.2	137.0±33.9		93.0±13.6	
8	2-4	5.1	49.3±10.7	59.8±5.6		67.9±4.7	
15	4-4	0.04[b]	44.2±7.3	447.8±7.6	***	60.7±3.3	
16	23-2	2.9	67.8±4.4	210.9±168.9		84.9±3.2	
20/33/45	23-3/34-2/ 236-2	7.2	67.5±5.6	68.7±9.2		84.2±3.9	
17	24-2	2.6	71.0±6.2	85.5±5.8		86.8±3.8	
25	24-3	0.02[b]	63.5±8.2	679.9±146.9	*	82.6±4.9	
28/53	24-4/25-26	8.9	65.5±8.6	14.6±7.1	**	84.4±4.5	
18	25-2	8.3	69.7±4.9	67.6±15.7		84.2±3.4	
26/50	25-3/246-2	1.1	69.4±8.3	286.2±219.2		85.8±3.9	
31	25-4	8.7	66.1±7.3	95.3±14.9		84.1±4.6	
32	26-4	3.5	53.7±6.8	76.3±21.2		31.7±12.7	
44	23-25	6.4	67.0±2.1	30.5±1.3	**	81.3±3.1	
46	23-26	4.7	67.6±1.9	62.7±6.8		78.4±4.5	
49/43	24-25/235-2	3.2	67.8±2.8	111.4±6.6	*	82.1±3.4	
66	24-34	5.9	64.5±3.0	75.8±4.8		79.0±4.2	
52/69	25-25/246-3	5.4	68.6±2.6	66.8±4.3		81.1±3.6	
70	25-34	7.1	65.4±2.5	71.7±7.2		77.2±5.4	
72/64	25-35/236-4	3.0	66.2±2.6	82.9±2.1		83.0±3.2	
41	234-2	0.8	65.9±2.5	83.0±7.4		83.7±3.1	
74/95	245-4	3.7	63.3±3.3	78.4±5.6		77.5±3.8	
110	236-34	0.9	62.2±0.7	74.8±5.1		78.9±3.7	
105	234-34	1.1	64.6±1.3	79.0±4.6		76.2±3.1	
97/117/86	245-23/2356-4/2345-2	0.2	67.1±1.3	89.8±1.5		80.0±2.5	
101/150	245-25/ 236-246	3.4	65.5±0.2	81.4±7.5		77.7±3.5	
118	245-34	2.0	63.6±0.1	74.9±5.2		77.7±2.9	
103/71	246-25/26-34	1.4	66.6±2.4	86.7±4.0		82.2±2.9	
138	234-245	0.3	64.2±9.1	93.2±3.0		78.6±2.3	
136	236-236	0.1	62.0±2.9	113.0±3.0		74.3±6.7	
149/77	236-245/34-34	1.9	63.5±0.3	75.8±4.7		76.1±2.6	
176	2346-236	0.1	65.0±0.7	85.3±5.5		77.4±3.2	
Total		100.0	65.6±4.6	77.6±15.6	**	80.6±4.3	

BES: 2-bromoethane sulfonic acid Significant difference (D) in the residual mol percentage of each congener was examined by analysis of variance (F-test) followed by a Bonferroni multiple analysis. All results were compared with the BS culture after 56 days of incubation. The symbols *, ** and *** denote the significant differences at less than 5%, 1% and 0.1% of probability, respectively. [a] The proportions (mol%) of two congeners #15 and #25 were not accurate because the contents were less than the detection limit in 100 μg (365 mmol)of the Kanechlor-300/400 mixture used in this study.

BS 培養物では、その気相中からメタンが高頻度に検出されていた。そこで、メタン生成菌阻害剤である BES を添加し、その影響を評価した。BES 添加培養物における阻害は、全 PCB 残留率(80.6±4.3 mol%)および脱塩素化率(20.7±4.2 mol%)において有意にみられた(Table 3-4、Fig. 3-4)。しかしながら、BS 培養物と比較した各 PCB 同族体に対する、BES による有意な阻害はみられなかった。ただし、培養物の気相中からは、メタンは検出されなかった。
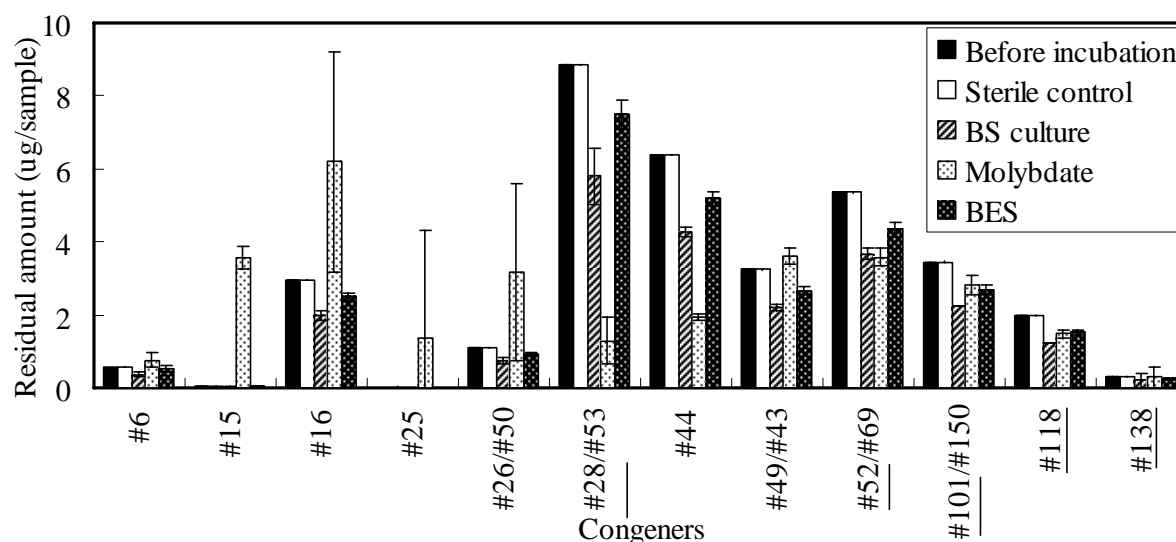
Fig. 3-4 The residual amounts of the selected PCB congeners in the individual incubation conditions

The congeners significantly affected by inhibitors and the indicator congeners with under line of Kanechlor-300/400. Numbers indicated under individual PCB structures correspond to IUPAC congener numbers.

3.3.7 BS 培養物中の微生物群集構造解析

PCR-DGGE 法と呼吸鎖キノン解析法を併用して、56 日培養後の BS 培養物中の微生物群集構造を解析した。BS 培養物の微生物群集は、15 回以上の継代培養によって 3 年以上分解活性維持された。BS 培養物中に含まれているキノン種は、0.01 μmol のメナキノン-6 と 3.56 μmol のメナキノン-7 のみで、それ以外のキノン種は検出限界以下であった(0.02 nmol in the culture)。PS 培養物では、メナキノン-6 と-7 は、それぞれ 0.99 μmol と 2.02 μmol であった。メナキノン-6 と-7 は、嫌気性微生物では *Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱および *Epsilonproteobacteria* 綱に分類される微生物種が保有するキノン種である(Katayama and Fujie, 2000)。

本微生物群集中の *Bacteria* 及び *Archaea* をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子断片の DGGE バンドパターンを Fig. 3-5 に示した。BS 培養物において *Bacteria* をターゲットとした DGGE バンドパターンは、PS 培養物中の優占バンドが異なっていた。DGGE バンドのクローニングと系統解析によって、これらの優占化バンドは *Firmicutes* 門と *Deltaproteobacteria* 綱の微生物種であることがわかった(Table 3-5)。これらの優占化バンドの違いが PCB 分解活性の向上と相関があるものと考えられる。
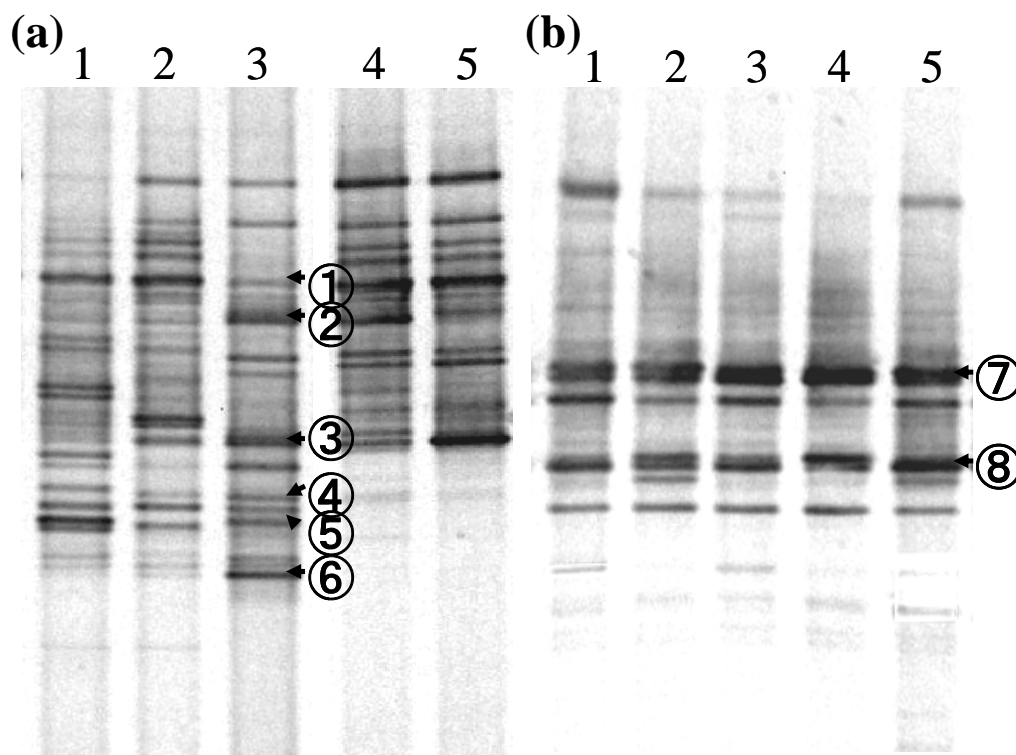
Fig. 3-5 The DGGE fragment patterns of the amplified 16S rRNA genes for *Bacteria* (a) and *Archaea* (b) from microcosms of the four cultures after 56 days of incubation

Lane 1 shows the profile of the original Kuridashi paddy soil. Lane 2 shows that of the paddy soil (PS) culture. Lane 3 shows that of the burnt soil (BS) culture. Lane 4 shows that of the BS culture amended with 2 mM of molybdate. Lane 5 shows that of the BS culture amended with 2 mM of BES. The bands numbered in circles were subjected to the DNA sequencing and the phylogenetic analysis as shown in Table 3-5.

Table 3-5 Phylogenetic assignment of the DGGE clones of partial 16S rRNA genes isolated from the microcosm in the BS culture

Band*	Phylum/class	Closest relative	Accession No.	Similarity (%)
1	*Firmicutes*	Uncultured bacterium clone Z39	AY754833	97
2	*Firmicutes*	Uncultured bacterium clone IIIA-3	AJ488093	100
3	*Firmicutes*	*Clostridium butyricum* Strain EIB3-3	AY458856	100
4	*Firmicutes*	Uncultured bacterium clone BF11	AY827462	96
5	*Deltaproteobacteria*	*Desulfovibrio vulgaris* DAM644	AF418179	99
6	*Chloroflexi*	Uncultured *Chloroflexi* bacterium sp.	AY921709	99
7	*Methanobacteria*	Uncultured *Methanobacterium* sp.	DQ507195	98
8	*Methanomicrobia*	*Methanoculleus palmolei*	Y16382	99

* The band numbers correspond to those shown in circle in Fig. 3-5.

3.3.8 阻害剤の微生物群集構造への影響

モリブデン酸と BES をそれぞれ別に添加した BS 培養物おける微生物群集構造解析結果を Fig. 3-5 に並挙した。最近縁種が *Firmicutes* 門に分類されたバンド 3 は、BES 添加培養物と比較するとモリブデン酸添加培養物中で弱いバンドとなってみられた。また、阻害剤添加培養物中では、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 綱にそれぞれ最近縁種を持つバンド 4、5、6 も弱いバンドとなってみた。これらのバンドは、BS 培養物中では継代ごとに確認されていた。一方、*Archaea* をターゲットとした DGGE バンドパターンでは、BES 添加による影響は見られなかった。これらの結果から、DGGE バンド 4、5、6 の欠損が、PCB 分解活性に影響したことが示唆された。

15 回の継代 BS 培養物について、既知の脱塩素化微生物の 16S rRNA 遺伝子断片の特異的検出用プライマーセットを用いて行った。*Dehalococcides* 属近縁菌は、15 継代中 1 回、*o*-17/DF-1 を含む *Chloroflexi* 門近縁菌は 7 回、*Desulfitobacterium* 属近縁菌は 11 回、*Dehalobacter* 属近縁菌は、7 回それぞれ検出された。しかしながら、これらの脱塩素化菌の検出と PCB 分解活性における相関は得られなかった。

3.3.9 資材の検討

微生物資材として供試した 3 種類のペレット、NIWA-1、NIWA-3 および TYK-1 の物理的化学的特性とそのペレットにおける全 PCB 残留率を Table 3-6 に示した。NIWA-1 では培養物中で培地が白濁し、微生物の定着は見られなかった。NIWA-3 では培養液が白濁することはなく、ペレット空隙から気泡の発生も見られたことから、微生物の定着能があると観察された。NIWA-1 と NIWA-3 は、鉄粉の含有/非含有によって、比表面積が著しく異なっていた。ただし、NIWA-3 培養物中の培養後の全 PCB 残留率は、培養後の殺菌コントロール培養物と比較して、有意ではなかった。

Table 3-6 Chemical and physical properties of pellets and the total PCB residues in the cultures after 56 days of incubation

Pellet	NIWA-1	NIWA-3	TYK-1[a]
Specific surface area (m^2/g)	19.2	57.5	35.7
Total pore capacity (ml/g)	0.047	0.046	0.573
Averaged pore diameter (nm)	97.9	31.5	47.3
Porosity (%)	35.2	n.d.	n.d.
Total residual PCBs (% (w/w))	n.t.	7.5	51.0
Total residual PCBs in sterilized sample (% (w/w))	n.t.	13.0	76.9

Abbreviation; n.d.: not detected, n.t.: not tested. All data were analyzed by TYK co. ltd. except the total residual PCBs.

[a] chemical properites were as follow (% (w/w)): SiO_2 47.6, Al_2O_3 24.6, Fe_2O_3 1.8, TiO_2 1.0, MnO 0.1, Cr_2O_3 0.0, ZrO_2 0.0, CaO 10.7, MgO 1.93, Na_2O 1.2, K_2O 8.6, P_2O_5 8.7, SO_3 0.1, ZnO 0.1, Igloss 0.6.
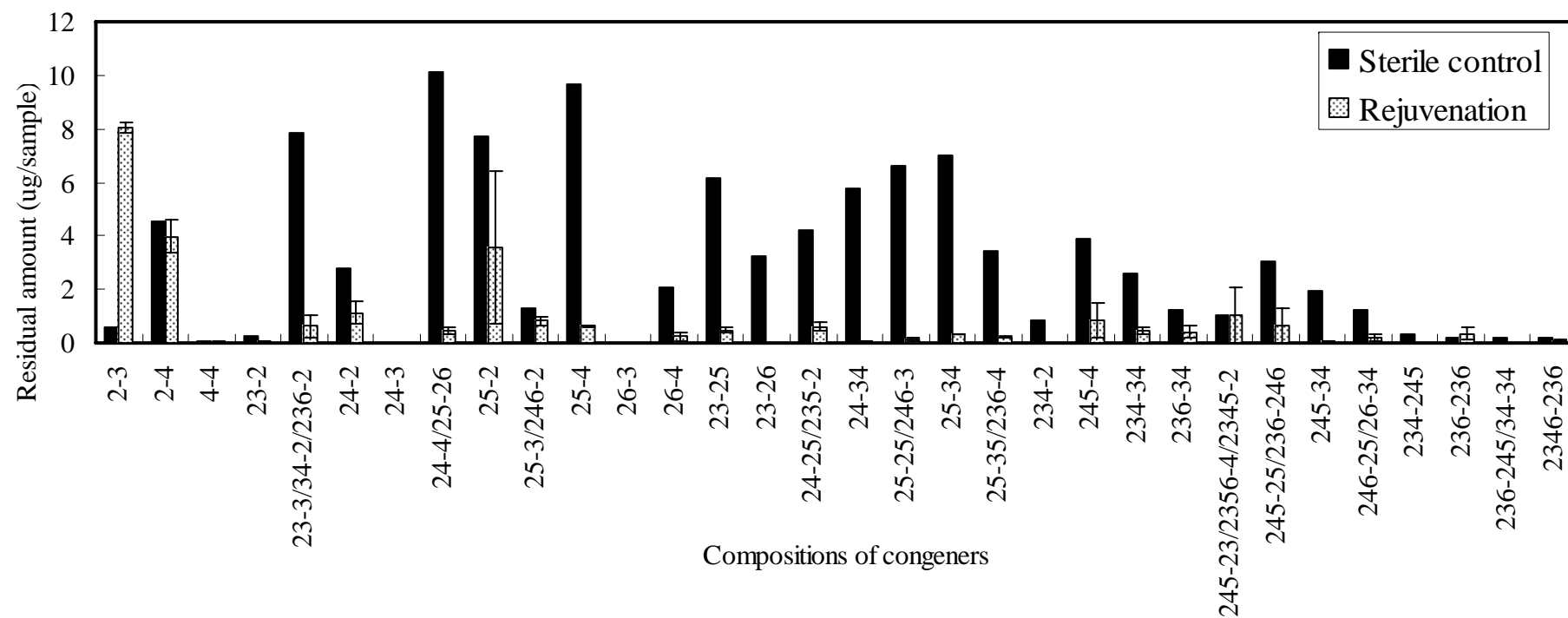
Fig. 3-6 The residual amounts of the PCB congeners in the culture contain pellets (TYK-1) compared with the sterilized culture

Numbers indicated under the figure correspond to individual composition of PCB congeners.

一方、TYK-1 では、培地の白濁等は見られず、微生物が資材に定着したことによるペレット間からの気泡の発生がみられた。微生物を接種した培養物中で得られた全 PCB 混合物残留率は 51.0%で、殺菌コントロール培養物における全 PCB 混合物残留率は 76.9%であったことから、少なくとも 25.9%の PCB 混合物が、この資材存在下で分解されたことが示された(Fig. 3-6)。

3.4 考察

本章では、PCB 混合物に対する嫌気的分解活性の向上を行った。また、微生物資材を模擬試験することにより、本 PCB 混合物分解活性の実用化への基礎知見を得た。

水田土壌培養物は、初期培養物において電子供与体、電子受容体の違いによる影響が見られなかった(第 2 章)。また、継代培養により獲得した PS 培養物も、培養条件の違い(継代環境、熱処理、阻害剤、pH、温度、振とう培養、酸化還元電位)による分解活性の向上はみられなかった。嫌気条件下の PCB 分解活性は、培養条件による影響を受けるとされているが、微生物接種源環境によって、影響因子も異なるため、最適培養条件は提唱されていない(Wiegel and Wu, 2000)。培養温度は、微生物増殖や酵素活性に影響すると報告されている(Wu et al., 1997)が、PS 培養物における 3 種の温度域では、分解活性の促進はみられなかった。また、培養物の pH の影響(Wiegel and Wu, 2000)や還元剤の違いによる酸化還元電位差に関しても、PS 培養物における分解活性の促進は起こらなかった。PCB の微生物利用効率の向上と、微生物群集攪拌による構造形成阻害を狙った振とう培養も、その効果は得られなかった。これらは、全て水田土壌が有する緩衝能に起因していることが考えられた。そこで、水田土壌自身を改変することを試みた。

BS は、PS を 550°C で 24 時間焼成して作成した。BS 培養物中における 56 日培養後の全 PCB 分解率は、操出 PS 培養物中の分解率の約 2.5 倍に相当した。本分解活性もまた、15 回以上の継代培養によって 3 年以上維持されている。PS 培養物における PCB 混合物の分解活性は、分解に伴った一部の低塩素化同族体の蓄積傾向が観察されたことから、脱塩素活性が含まれることが示唆されたが、本 BS 培養物における分解活性は、KC-300/400 混合物に含まれる幅広い PCB 同族体に対する分解率を向上し、低塩素化同族体の蓄積も見られなくなった。

BS 培養物における PCB 混合物分解活性は、土壌種やその化学的特性および土壌粒子サイズに関わりなく全ての BS 培地において、同等の向上がみられた。PS を基にした DPS や GPS でも比較したが、分解活性の向上が見られなかった。このことは、BS 培養物での嫌気的 PCB 分解活性の向上が、無機物組成や土壌粒子サイズの影響はほとんどないが、土壌中の有機物の除去と関係していることを示唆している。土壌有機分は、PCB などの非極性有機化合物を吸着しやすく、微生物利用度を低下させることが知られている(Voice and Weber, 1983, Lyytikäinen et al., 2003, Lee and Batchelor, 2004)。そのために、有機物のない BS を培地として利用したことで、PCB の微生物利用度が増加したと考えることができる。しかしながら、こ

の分解活性の促進は、PCB の微生物利用効率の向上だけでは説明することができない。BS 培地では、PS 培地に含まれる未特定の脱塩素活性阻害物質を低減できていた可能性もある。また、BS および PS は、培養物中で微生物担体としての役目を果たしているものと考えられている。そのため、BS によって形成された物理的条件が分解活性の向上に影響していることも考えられた。例えば、逆流式嫌気的バイオリアクター(upflow anaerobic blanket reactor 以下 UASB とする)における高効率メタン生成は、グラニュール中の異なる微生物種の物理的すみわけに起因していると考えられている(Sekiguchi et al., 1999, Zheng et al., 2006)。BS 培養物における嫌気的 PCB 分解活性を向上したメカニズムの解明が必要とされていることから、第 4 章において、微生物生息場としての環境制御についての基礎知見を研究する。

BS 培地は、BS と酢酸塩・乳酸塩を含む AL 培地からなる。PCB 混合物の分解は、培養物中に酢酸が存在している間に起きており、微生物増殖との相関が見られた。乳酸塩は、硫酸塩の減少に伴って初期 7 日間でほぼ消費された。培養物中で検出されたピルビン酸やプロピオン酸は、乳酸の代謝によって生成する。酢酸もまた再生される。BS 培地は、酢酸塩・乳酸塩以外の有機物を含まないため、水素もまたこれらの代謝によって生成されたであろう。メタンや二酸化炭素は、酢酸から生成する。しかしながら、メタンやプロピオン酸などの化合物は、嫌気発酵の最終産物であり、これらを嫌気条件下で新たな炭素源や電子供与体として利用することは難しい。これらの結果から、本培養物中における PCB 混合物の脱塩素化活性には、酢酸塩が、直接的もしくは間接的に電子供与体もしくは炭素源となっていることが示唆された。PS 培養物においては、PS に含まれる有機物等の影響によって、このように電子供与体を推定することができなかった。また、本培養物は、酢酸塩・乳酸塩の再添加によって、56 日培養後の PCB 分解活性をさらに促進させた。56 日培養後の本培養物中には、ピルビン酸や水素も検出されており、これら複数の電子供与体および炭素源の消費によって、脱塩素活性が再生され得ることも示された。過去の研究から、*Chloroflexi* 門に分類される PCB 脱塩素化微生物は、酢酸とその他の有機酸を電子供与体もしくは炭素源として含んだ培地(条件によって水素も添加)中で集積され、脱塩素活性を発揮してきた(Cutter et al., 2001, Cutter et al., 1998, Holoman et al., 1998, Wu et al., 2000, Maymó-Gatell et al., 1997, Adrian et al., 1998)。このことから、本培養物は既知の脱塩素化微生物の生育環境としての可能性も、十分にあったと推測された。しかしながら、後で述べるように分解活性と脱塩素化微生物の検出には相関は得られなかった。

また、BS 培養物における PCB 分解速度は、AL 培地に含まれる硫酸塩が消費される培養初期 7 日間で遅くなった。これは、硫酸塩を消費する硫酸還元細菌が、PCB 混合物の分解活性に何らかの影響を及ぼしたことを意味している。また、酢酸塩・乳酸塩再添加により PCB 混合物分解は再活性化したが、その分解速度は緩慢であった。AL 培地中の硫酸塩由来の硫化物イオンを FeS として沈殿されるには、鉄イオンが不足している。そのため、多くの微生物にとって有害な硫化水素が培養物夕に生成したことが、原因のひとつとして考えられる。しかし、現段階では、はっきりとした原因は突き止められなかった。

硫酸塩を含まない SF 培地における PCB 混合物分解活性は、分解速度の違いはみられたが AL 培地における BS 培養物と同等であった。しかし、AL 培地中でみられた培養初期の分解活性の阻害は、SF 培地中ではみられなかった。一方、酢酸塩・乳酸塩再添加を行った SF-BS 培養物では、196 日培養でも酢酸塩・乳酸塩をはじめとする有機酸が残存していたため、全 PCB 残留率の減少傾向がみられた。これらの結果から、硫酸塩の存在が PCB 分解活性を阻害する可能性と、酢酸塩・乳酸塩が電子供与体もしくは炭素源として利用されることで、PCB 混合物の分解活性が維持されることが示唆された。ただし、電子供与体および炭素源再添加によって、長期培養物における PCB 分解活性の停滞は解消されるが、その分解速度は低下したことから、未特定代謝産物や老廃物の蓄積によって、他の阻害効果が存在する可能性も考えられた。今後、これらのメカニズムの解明が必要である。

本章では、BS 培地の 28 日培養物において、添加した KC-300/400 混合物 25 μg/g-BS (6.7 μg/ml-culture) に対して、0.064 μg-atoms-Cl/g-BS/day (0.49 nmol-Cl/ml-culture/day)という最高分解活を獲得した。過去に報告された PCB 混合物に対する代表的な嫌気的分解活性を以下に例示する。Quensen ら(1990)は、Hudson River の PCB 汚染底質どを用いて、500 μg/g の PCB 混合物(Aroclor 1242,1248, 1254, 1260)を 0.034 μg-atoms-Cl/g-sediment/day の割合で脱塩素したことを報告している。 近年、Bedard ら(2006)は、500 μg/ml の Aroclor 1260 を 19.8±3.1 nmol-Cl/ml-culture/day で脱塩素化する液体培養物を獲得した。この液体培養物獲得に至る過程(3 継代培養物中)で、5 μg/ml の Aroclor 1260 に対して 0.16±0.03 nmol-Cl/ml-culture/day で脱塩素する能力があったことを報告している。Natarajan ら(1996)も、UASB のグラニュールにおいて、70～75 %の Aroclor 1254 (50 μg/ml)を 220 ng-total-PCBs/ml-culture/day の割合で脱塩素化したことを報告している。Natarjan らの結果は、PCB 濃度が本研究における濃度よりも約 10 倍高いため正確に比較できないが、BS 培養物における分解速度(238 ng-total-PCBs/ml-culture/day)よりも遅かった。また、脱塩素化産物としての低塩素化物の蓄積が見られない現象は、Natarajan ら(1996)のグラニュールにおける報告を除いて、知りうる限り本 BS 培養物でしか報告されていない。これらの結果から、本 BS 培養物は、過去に報告された PCB 混合物分解培養物と同等、もしくは十分に競合的な分解活性を有していることが示された。

操出 BS 培地における 56 日培養物中の脱塩素化効率は、93.9 nmol-Cl/mmol-e-donors であった。この効率を用いると、分解活性阻害因子が一切存在しない場合、PCB 混合物 100 μg 中に含まれる 731 nmol の塩素原子を完全に脱塩素化するためには、7.8 mmol の電子供与体が必要であった。単純に 1 プロトン(電子)によって 1 塩素原子が置換されると考えた場合、酢酸塩が主な炭素源もしくは電子受容体である本培養物において、PCB 混合物 100 μg を完全脱塩素化するには、約 0.24 μmol の酢酸塩が必要となる。つまり、本 BS 培養物では、わずか 0.017% の電子供与体が脱塩素化に利用されている計算となった。純粋培養系を用いたクロロフェノール類の脱塩素化効率と比較すると、本分解活性には、まだ活性向上の余地があることが示唆された(Bouchard et al., 1996, Mohn and Kennedy, 1992, Utkin et al., 1995)。

BS 培養物の微生物群集中の呼吸鎖キノンを解析したところ、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱及び *Epsilonproteobateria* 綱が検出された。また、16S rRNA 遺伝子断片の PCR-DGGE 解析結果からも、*Firmicutes* 門(*Clostridia* 綱)の集積がみられた(Fig. 3-5)。それゆえ BS 培養物中の微生物群集は、*Firmicutes* 門が優占化していることが考えられた。これは、PS 培養物でも同じ傾向が見られていたが、他の PCB 脱塩素化微生物群集でも *Firmicutes* 門が高頻度に検出された(Bedard et al., 2006, Yan et al., 2006)。PS 培養物と BS 培養物における PCR-DGGE バンドパターンは、*Archaea* をターゲットとした場合には違いが見られなかったが、*Bacteria* をターゲットとした場合は異なっていた(Fig. 3-5)。PS 培養物とバンドパターンの異なった *Bacteria* バンドは、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門の微生物種に分類された。それゆえ、BS 培養物における PCB 分解活性の向上は、これらのメンバーと相関があることが示された。

Chloroflexi 門に含まれる *Dehalococcoides* 属や、*o*-17/DF-1 グループや、*Dehalobacter* 属、*Desulfitobacterium* 属について、BS 培養物中での PCR 特異的検出を行ったが、その検出頻度は散発的であったことから、分解活性との直接相関がないことが示唆された。ただし、本培養物中のこれらの微生物種の存在比が非常に少ないために、検出されたかった可能性も否定できない。この結果は、PCR-DGGE 解析結果においても、脱塩素化菌近縁種が検出されなかった結果と一致した。他の研究者による PCB 脱塩素化培養物中では、*Chloroflexi* 門の微生物種の頻出が報告されている(Bedard et al., 2006, Fegervold et al., 2006, Yan et al., 2006)。BS 培養物中では、電子供与体としての酢酸塩や気相中に水素や二酸化炭素が検出されたことから、*Chloroflexi* 門の *Dehalococcoides* 様細菌の増殖条件は満たしているが(Cutter et al., 2001, Wu et al., 2002, Fennell et al., 2004)、BS 培養物中の DGGE プロファイルからは、1 種の *Chloroflexi* 門しか検出されなかった。これらの結果から、BS 培養物中に PCB を嫌気的に分解する微生物種が存在する可能性も考えられた。

BS 培養物における PCB 混合物分解活性は、硫酸塩の存在により影響を受けることが示唆された。硫酸塩は、硫酸還元細菌の電子受容体であることから、硫酸還元菌生育阻害剤であるモリブデン酸添加による影響を評価した。モリブデン酸添加 BS 培養物では、低塩素化同族体の蓄積と、いくつかの同族体の分解活性の向上がみられた。一方、モリブデン酸非添加 BS 培地中では、1 塩素化物やビフェニルおよび低塩素化同族体の蓄積も見られないことから、硫酸還元細菌が、低塩素化同族体の分解に関与している可能性が示唆された。本研究では、PCB 混合物を用いているために、脱塩素化産物を追跡することは困難であるが、増減のみられた同族体から、いくつかの同族体に限った脱塩素化経路が予測された(Fig. 3-7)。BS 培養物中の PCB 分解活性は、*meta*-、*para*-位の脱塩素化だけでなく、*ortho*-位の脱塩素化も行っていることが考えられた。この結果は、BS 培養物中で KC-300/400 混合物のほとんどの同族体が有意に分解する結果とも一致した。
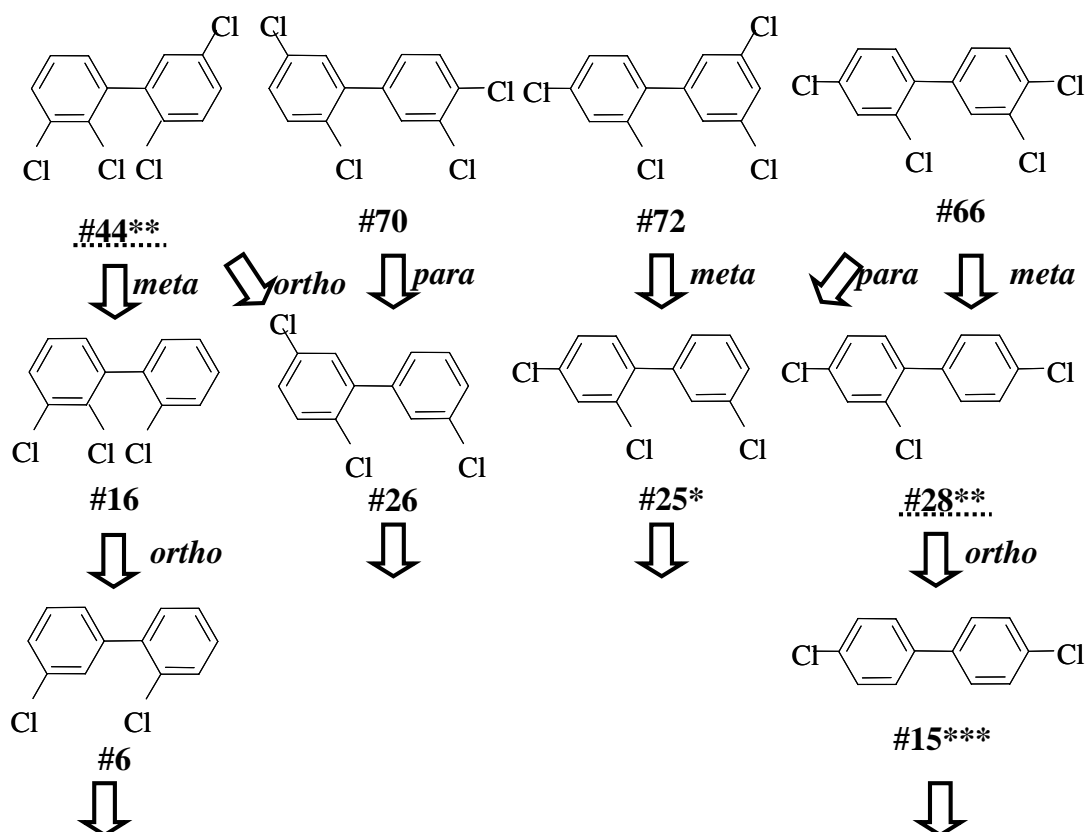
Fig. 3-7 Possible dechlorination pathways in Kuridashi BS culture. Numbers indicated under individual PCB structures correspond to IUPAC congener numbers

Symbols *, ** and *** on the congener numbers correspond to the results of a Bonferroni multiple comparison as shown in Table 3-4. Congeners, #6, #15, #25 and #26 were accumulated congeners more than 100 mol%, while #28 and #44 with dotted line were significantly decreased congeners.

　また、モリブデン酸添加、非添加 BS 培養物の DGGE バンドパターンを比較すると、モリブデン酸添加物中では *Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱、*Chloroflexi* 門のバンドの欠損が確認された。特に、Fig. 3-5 におけるバンド 5 は、硫酸還元細菌 *Deltaproteobacteria* 綱に含まれる *Desulfovibrio* 属に分類される。また、前述の通り、BS 培養物において PCB 分解活性は、硫酸塩消費過程における PCB 分解速度は遅かった。嫌気的 PCB 分解活性におけるモリブデン酸添加による阻害は、過去に他の PCB 脱塩素化微生物群集に関しても報告されている。例えば、Baltimore 海洋性底質土から得られた微生物群集による *ortho*-脱塩素活性の阻害(Holloman et al., 1998)や、イタリアの Venice Lagoon 中の底質土中の *meta*-、*para*-脱塩素活性の阻害(Fava et al., 2003)などが報告されている。しかしながら、モリブデン酸添加 BS 培養物では、低塩素化同族体の蓄積だけでなく、いくつかの同族体の分解も有意であった。この現象は、PCB 脱塩素活性における硫酸還元細菌の間接的な関与(Kim and Rhee, 1997)、もしくは硫酸還元細菌の脱塩素化細菌生育と競合(Wu et al., 2002, Zwiernik et al., 1997)の可能性を示唆している。

本 BS 培養物において、メタン生成が検出されていたことから、PCB 分解活性に対するメタン生成菌の関与も考えられた。しかしながら、BES 添加 BS 培養物では、メタン生成は完全に阻害されたが、各 PCB 同族体への有意な影響はみられず、全 PCB 残留率に対して阻害効果がみられた。PCB 脱塩素化活性は、メタン生成条件下での報告や、BES 添加による阻害が多く報告されている(Wiegel and Wu, 2000)。また、Ye ら(1999)は、硫酸還元細菌が BES を電子受容体として利用し得ることと、メタン非生成細菌による脱塩素化活性の阻害を報告している。BS 培養物において、モリブデン酸添加物と BES 添加培養物の PCB 分解活性の違いはみられたが、PCR-DGGE プロファイルの結果では、いくつか *Firmicutes* 門に分類されたバンドパターンに違いがみられただけであった。

最後に、3 種類のペレットを微生物資材として供試して、微生物バリヤー開発への基礎知見を得た。NIWA シリーズは、その気孔率や形状が、当初イメージした微生物資材に大変近かったことから、PCB 分解微生物資材の先行試験として供試した。NIWA-3 では、微生物定着能および、活性炭の持つ PCB 吸着能も評価することができた。NIWA シリーズは、ペレット硬度も高く、ペレット粉砕による全量抽出も困難であったため、その高吸着能により分解活性として評価することができなかった。本結果を踏まえて吉田らは、当研究室において、TCP(Trichlorophenol)の脱塩素活性および嫌気分解活性を有する微生物群集の資材化試験を開始した(環境省成果報告書, 2006)。本研究では、TCP 脱塩素化活性の評価に成功したペレット(TYK-1)を用いて、PCB 混合物分解試験を行った。TYK-1 は、23.1%の PCB 混合物吸着が見られたが、微生物定着性も視認できた。微生物接種・非接種培養物間の PCB 残留率差も有意であった。これらの結果から、酸化条件下で有機物を完全に酸化した焼成物を材料とし、表面積が 35.7 m^2/g 以上(空隙率の相関は不明瞭；視覚上表面に気孔が見られる形状)が、PCB 分解微生物資材構築の基礎資材であることが示唆された。微生物資材の応用に向けた考察は、総括で言及する。

以上本章において、PCB 混合物に対する嫌気分解活性の向上に成功した。本分解活性は、幅広い PCB 同族体を分解することができ、他の研究者が確立した活性とも十分競合し得た。また、本分解活性は、電子供与体の再添加によって分解促進された。微生物群集には、*Firmicutes* 門が優占化しており、特に硫酸還元細菌が脱塩素活性および低塩素化同族体の分解に関与していることが示唆された。これらの結果から、焼成固形物が、PCB 混合物分解バイオレメディエーション技術の開発に対して、非常に大きな可能性を秘めていることが示唆された。

第 4 章　嫌気的 PCB 混合物分解微生物群集の液体培養とその特性評価

4.1 概要

第 3 章で焼成土培地における分解活性の向上と、その微生物群集構造の変化が分解活性に影響することがわかった。PCB 混合物分解活性において、その分解機構の解明や分解微生物種の解析を進め、PCB 分解微生物資材における先行知見の蓄積するため、PCB 混合物分解微生物の液体培養物の獲得を試みた。ここで、液体培養物とは、土壌様物を含まない培養物(Soil-free culture)と定義し、その取扱いの容易さと、各種評価試験が行いやすくなることに期待して実験を行った。

液体培養物を獲得するにあたり、土壌代替物としての無機素材(ガラスビーズ)含む培地と、ガラスビーズを含まない培地への直接接種を行った。このとき、粒径が均一なガラスビーズを利用することで、土壌粒子を模擬した各種粒径変化による微生物群集構造と分解活性への影響も調査した。分解活性の継代維持率を求めた結果、粒径 0.5 mm のガラスビーズを使用することで液体培養物の獲得成功率が向上することがわかった。また、一度ガラスビーズ培養物で活性維持された培養物は、その後ガラスビーズを除去しても活性維持できることがわかった。一方、粒径の違いによって微生物群集構造に変化が見られたが、分解活性との相関ははっきりしなかった。これらの結果は、特定のガラスビーズ粒径によって形成される間隙径によって、PCB 分解微生物群集が変化することや、PCB 混合物分解微生物種における微生物生息空間に最適値が存在することが示唆された。

液体培養物中の PCB 分解活性は、焼成土培養物で獲得した活性とは異なっていたが、全 PCB 分解率は約 40 mol%で高活性であった。また、液体培養中の微生物群集構造は、水田土壌培養物とも焼成土培養物とも異なっていたが、*Firmicutes* 門の優占化が確認された(既知の脱塩素化菌は、脱塩素活性とその存在の相関は得られなかった)。このことから、液体培地を用いることで、微生物群集構造に変化がみられ、PCB 分解活性の一部にも変化がみられることがわかった。この液体培養物を用いて、PCB 混合物分解活性制御因子(電子供与体、阻害剤、単一 PCB 同族体)の解明を行ったが、現段階ではその特定には至らなかった。本液体培養物への培地の再添加によって、添加した PCB 混合物に含まれるほとんどの同族体を分解できた。さらに、同培養物に高濃度 PCB(1000 μg)を分解させたところ、56 日間で 60 μg 全 PCB 混合物を分解した。

4.2 実験方法

4.2.1 PCB

多様な分解活性を評価するために、第 2 章と同様に 3 塩素化物(39.9% (w/w)) と 4 塩素化物(44.4% (w/w))を中心に 50 種以上の異なる同族体を含む PCB 混合物を使用した。PCB 混合物

は、Kanechlor-300 と-400 (Kanegafuhi Chemical Industry, Osaka, Japan)を 1：1 で混合し、1 g/l のアセトン溶液とした。

4.2.2 担体

本実験では、これまで使用してきた土壌および土壌改変物を模擬した無機担体として、ガラスビーズ(Glass beads；以下 GB と略す)を使用した。GB は、均一な粒径であることから、粒径の異なる D_{50}=0.05 mm、0.5 mm、2.0 mm の 3 種の GB(Potters-Ballotini Co. Ltd., Ibaraki, Japan) を使用した。GB は、10% HNO_3 溶液で洗浄し、蒸留水で HNO_3 溶液を完全に洗い流し、乾燥してから供試した。

4.2.3 PCB 分解微生物群集

当研究室において、PCB 混合物分解微生物群集の維持は、AL 培地を使用し 56 日間隔 5% 継代によって行った。実験方法や培地組成などは、第 2 章、第 3 章で述べたとおりである。

各粒径の GB 4 g を別々に入れた 100 ml のガラスバイアルを準備し、あらかじめオートクレーブ処理(121°C、30 min)を施した。このバイアルに、嫌気性チャンバー内で(Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI)1 g/l の PCB 混合液 100 µl をアセトン溶液と AL 培地 15 ml を添加した。GB を含まないサンプルも同様に準備した。バイアルの気相は、100%窒素ガスで飽和し、テフロンライナー付きブチルゴム栓で密封した。この GB を含む AL 培地を加えた培地/培養物を GB 培地/培養物、GB を含まない AL 培地のみを加えた培地/培養物を L 培地/培養物と定義する。各 GB 培地/培養物および L 培地/培養物について、土壌を含まないことから、これらを液体培地/培養物と定義する。また、GB 培地については、各粒径サイズを数字で示し、培地/培養物名とした(GB0.5, GB2.0, GB0.05)。

既に PCB 分解活性が確認された水田土壌培養物を微生物接種源とし、各新培地への 5% (v/v)接種を行い、暗条件 30°C で 56 日静置培養した。PCB 残留量は、殺菌コントロール培養物中の PCB 残留量と比較した。全実験は、2 連もしくは 3 連で行った。殺菌コントロール培養物は、121°C、30 分のオートクレーブ処理後、0.1%のパラホルムアルデヒドを添加し同条件下で培養した。

4.2.4 培養条件

液体培養物は、改変した各培養条件の効果を確認するために、PS 培養物を接種源として各液体培地へ 2 回継代することで、獲得を試みた。また、GB0.5 培地における液体培養物獲得率が高かったことから、その選抜効果を検証するために、PS 培養物から GB0.5 培地へ 1 回継代培養した培養物を、各液体培地へ 2 回継代することで、その液体培養物の獲得率を求めた。この際、各培養条件の効果を確認するために、各液体培養物へ 2 回継代培養した培養物に関して、培養物中の全 PCB 残留率および各同族体別の残留率で比較した。分解活性の有意性は、比較用に継代培養した PS 培養物の分解活性を対象として、全 PCB 分解活性は Scheffe 多変量

解析に基づく有意差検定(F-test)を、各同族体別の分解活性は Aspin-Welch 検定によりそれぞれ評価した。

GB0.5 培養物について、その分解活性制御因子を特定するために、AL 培地および SF 培地(第 3 章参照)における炭素源を改変した培地を用いた。試験した炭素源(電子供与体)は、20 mM の酢酸、ギ酸、乳酸、ピルビン酸、20 mM 酢酸+5% H_2 および 20 mM 酢酸+ 20 mM 乳酸をとした。また、微生物群集に対する阻害剤として、硫酸還元菌生育阻害剤であるモリブデン酸および、メタン生成菌阻害剤である 2-bromoethane sulfonic acid (BES)をそれぞれ 2 mM ずつ別々に添加した培地も準備した。この他、熱耐性を試験するために、微生物源接種後に 100 °C、10 分の加熱処理を施した培養物と、PCB 混合物ではなく 50 μM の#61(2,3,4,5-PeCB)を電子受容体として添加した培地も準備した。これらの培地へは、20 mM の酢酸と乳酸を添加した。各培養物の分解活性は、全 PCB 残留率に関して PS 培養物と比較して 1%, 5%, 10%の有意差を検定した。ただし本実験は、時間の都合上、各条件における 1 回継代培養物しか評価できなかった。

PCB 混合物に対する最高分解活性を確認するために、本 GB0.5 培地における 3 ヶ月培養物に体して、AL 培地 15 ml を再添加し 56 日培養した。また、同様に GB0.5 培地における 3 ヶ月培養物に対して、AL 培地 15 ml 添加時に新たに 1000 μg の PCB 混合物を再添加し 56 日培養した。いずれも、その PCB 混合物の残留率から分解活性を評価した。

4.2.5 PCB 残留物の検出

PCB 残留物の検出は、第 2 章でその詳細を述べたので、ここでは、簡略化する。PCB 画分は、クロロホルム/メタノール(2:1)混合溶媒で有機溶媒層に抽出した。この有機溶媒層から PCB 画分を *n*-hexane 展溶し、シリカゲルカラムと不活性化したフロリジルカラムを用いて精製した。PCB の分析は、HT8 キャピラリーカラム(0.22 mm ID, 50 m L, 0.25 μm FT; SEG, Austin, TX, USA)を接続した GC/ECD (^{63}Ni ECD 付き GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan)で行い、データ採取と解析は、Shimadzu Class GC Station (Shimadzu, Kyoto, Japan)で行った。KC-300/400 混合物中の各 PCB 同族体は、その含有割合から、培養サンプル 100 μg 中の絶対重量を換算した。全 42 種の PCB 同族体が検出され、各 PCB 同族体の検出限界は、35.7 ng であった。ただし、IUPAC 番号(以下#で示す) 56 と#60 は、培養物からの抽出物が妨害ピークとなって検出できないことがあったため、また、2 種の指標 PCB 同族体である #153 と#180 は、それぞれ検出限界未満であったため、それぞれ定量から除外して計算した。この計算法によって算出された PCB 同族体の総和は、Kim らによって報告された市販品 KC-300/-400 の混合物の総和に対する 83.0% (w/w)に相当する。また、PCB 混合物 100 μg の添加回収率は、94.2%±3.5% (w/w)で、各同族体別では 91.3%以上の回収率が得られた。

PCB 分解活性は、培養物中の全 PCB 残留量および各同族体別の残留量について、殺菌コントロール中の各 PCB 残留量を比較することで評価した。液体培養物について、56 日培養後の殺菌コントロール培養物では、10.4%±0.5% (w/w)の減少率が見られたが、この殺菌コント

ロールの値を 100%として培養物中の PCB 分解率を計算した。全 PCB 残留量における分解活性の有意性は、Scheffe 多変量解析に基づく有意差検定(F-test)によって評価した。また、各同族体の有意な分解活性は、Aspin-Welch 検定を行い評価した。

脱塩素化率は、全塩素原子の減少率から求めた。脱塩素化率は、添加した PCB 混合物の減少量から計算された塩素原子の脱塩素化モル量(nmol-Cl)と培養物中の電子供与体としての酢酸塩と乳酸塩の消費モル量(mmol-e-donors)から算出した。

また、液体培養物間の分解活性の違いを分類するために、クラスター解析(*1 参照)を行った。解析用データは、各培養物中の PCB 同族体量を一覧表にしたものを、公開クラスター分析プログラム(http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.cgi)を用いて解析した。

*1 クラスター解析 : 性質の異なるものが混在する集団の中から、その類似度から似たものを集めて集落(クラスター)を作り分類する数値分類法の総称である。特に、ユークリッド平方距離(または標準化ユークリッド平方距離)によって、より明確に分類可能なウォード法を採用する場合が多い。

4.2.6 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)

Fluorescent *in situ* hybridaization(FISH)は、細胞固定、ハイブリダイゼーション、プローブ洗浄、観察の順で行った(Amann et al, 1990, Daims et al., 1999, Yoshida et al., 2005)。

1 ml 程度の培養物試料を 30 mM PBS 緩衝液(30 mM Na_2HPO_4, 30 mM NaH_2PO_4, 390 mM NaCl, pH7.2, sterilized)を 10 mM に希釈した溶液で 3 回洗浄し、パラホルムアルデヒド溶液(2 g パラホルムアルデヒドを温 dH_2O 65 mL 中 6N NaOH 滴下溶解) 2 ml で懸濁し、氷上で 2 時間培養した。これを 10 mM PBS 緩衝液で洗浄後、1 ml PBS 溶液に溶解し 100%エタノールを等量加えてサンプルを調製した。また、グラム陽性菌の含有割合の高いサンプルに対しては、パラホルムアルデヒド溶液洗浄過程を省略した。このサンプルを氷上で数秒間のソニック細胞分散を行い、3 µl を 10 穴スライドガラスに滴下し、乾燥後、50%、80%、100%エタノール溶液に 3 分間ずつつけて脱水した。本章では、*Bacteria* の 16S rRNA をターゲットとした EUB338mix(5’-gct gcc tcc cgt agg agt-3’)、*Archaea* の 16S rRNA をターゲットとした ARC915(5’-gtg ctc ccc cgc caa ttc ct-3’)、およびネガティブコントロールプローブ NonEUB(5’-act cct acg gga ggc agc-3’)を用いてハイブリダイゼーションを行った。蛍光標識は、Cye3 でラベルした。

ハイブリダイゼーションは、スライドガラス上に固定した 3 µl の細胞試料に対して、10 µl の調製したハイブリダイゼーション溶液と 1 µl プローブ溶液(30 ng/µl)を滴下した。ハイブリダイゼーション溶液の組成を以下に示す ; 5 M NaCl(Sterilized) 180 µl、1 M Tris-HCl(Tris 12.1 g, pH 7.0) 20 µl、Formamide 200 µl(EUB388 の場合のみ)、dH_2O 800 µl(EUB388mix の場合は 600 µl、10% SDS 2 µl。50 ml 容ネジ付きチューブに、余ったハイブリダイゼーション溶液を湿らせたキムワイプを折りたたんで敷き、スライドガラスを入れて密封後、46°C で 90 分保温した。

50 ml 容ネジ付きチューブに、プローブ洗浄液を調製し、あらかじめ 48°C で保温した。プローブ洗浄液の組成を以下に示す ; 1 M Tris-HCl(pH7.0) 1ml、5 M NaCl 9 ml(EUB388 の場合は 2.15 ml)、dH_2O で 50 ml にメスアップ。ハイブリダイゼーション後のスライドガラスを、この保温した洗浄バッファー中へ浸して、48°C で 20 分保温することでサンプルを洗浄した。20 分後、氷冷しておいた超純水でスライドの両面の洗浄液を洗い流し、風乾した。その後、DAPI(4',6-diamino-2-phenylindole)で対比染色した後、カバーガラスを被せて観察した。

4.2.7 キノン解析

呼吸鎖キノンは、PCB 抽出と同時にクロロホルム/メタノール(2:1)によって抽出した。キノン画分は、シリカゲルカラムを用いて分画溶出し、精製後、HPLC により分析した。詳細は第 2 章に述べた。

4.2.8 DNA 抽出および PCR-DGGE 解析

培養物中のゲノム DNA は、ISOIL extraction kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。微生物群集構造解析は、PCR-DGGE 解析を用いた。PCR は、*Bacteria*(341F/518R)および *Archaea*(344F/518R)の 16S rRNA の部分配列増幅用プライマーセットを用いた。PCR 条件、及び DGGE 条件は、前章で述べたとおりである。微生物群集構造の系統学的解析は、PCR 産物に関するランダムクローニングによってクローンを作成し、得られた DNA 配列についての相同性検索をすることで、系統解析を行った。

また、PS 培養物を接種源として、その後各培地で 4 回継代培養した各培養物における DGGE バンドパターンを解析した。*Bacteria* をターゲットとした DGGE の写真(Fig. 4-3)について、レーンごとに各バンドの光強度をパーセント数値化し、その値を一覧表にしたものについて公開クラスター分析プログラムを用いてクラスター解析した。

4.2.9 脱塩素化菌の検出

第 3 章における 4 種のプライマーセットを用いて、16S rRNA 遺伝子配列に対する既知の脱塩素化微生物の特異的検出を行った。

4.3 結果

4.3.1 PCB 分解液体培養の獲得

Table 4-1 に、PS 培養物から 2 回継代した各液体培養物における全 PCB 残留率を示した。その結果、PS 培養物で得られた分解活性(第 2 章参照)は、PS 培地での継代培養結果と比較して、GB0.5 培地へ継代した場合でのみ有意な向上が見られた。GB2.0 培地では、全 PCB 残留率の減少がみられたが、そのばらつきが大きいために統計学上の有意差は得られなかった。

L 培地および GB0.05 培地においては、全 PCB 残留率の減少は見られなかった。また、各液体培養物における各 PCB 同族体別の分解活性について、PS 培養物に対する有意差検定を行ったところ、GB0.05 培養物では#40(P< 0.01)、#42(P< 0.05)、#66(P< 0.05)の 3 種について、GB2.0 培養物では#103(P< 0.05)の 1 種について、それぞれ分解率の低下がみられた(data not shown)。それ以外の培養条件および同族体においては、そのばらつきが大きいために有意差は得られなかった。これらの結果から、PS 培養物を接種源とした液体培養物は、GB0.5 培地を用いた場合でのみ獲得できることが示された。

Table 4-1 Effects of particle size on the total residual PCBs in second transferred cultures from PS culture

Conditions	PS	L	GB2.0	GB0.5	GB0.05
Material/Particle size	Soil	Non	GB/2.0	GB/0.5	GB/0.05
Residual amount (weight%)[a]	86.0%±2.6%	89.2%±8.3%	77.3%±11.6%	72.9%±6.8%*	92.5%±2.0%

Abbreviations, PS; paddy soil, L; liquid, GB; glass beads. The condition names were explained in materials and methods. The experiments were performed more than triplicate. [a] Significant decrease in the total residual weight% was compared with PS culture by analysis of variance (F-test) followed by a Scheffe multiple comparison test. The symbol * denote the significant differences at less than 5% of probability.

4.3.2 PCB 分解液体培養物の継代維持

Table 4-2 に、PS 培養物を GB0.5 培地へ接種・培養後、各液体培地へ 2 回した各培養物における継代後の全 PCB 残留率を示した。全 PCB 残留率は、GB0.5 培地と L 培地を用いた場合、PS 培養物と比較して有意に減少した。GB2.0 培地における全 PCB 残留率は、有意差は得られず、GB0.05 培地では、PS 培養物に対する有意な増加がみられた。また、各 PCB 同族体別における PS 培地に対する有意差検定を行ったところ、L 培地では、#8(P< 0.05)、#27(P< 0.01)、#25(P< 0.01)、#28(P< 0.01)、#72(P< 0.05)、#40(P< 0.05)、#149(P< 0.05)、#105(P< 0.05)で有意な分解がみられた。GB0.5 培地において有意な分解が確認された PCB 同族体は、#27(P< 0.01)、#25(P< 0.01)のみであった。一方、GB2.0 培地および GB0.05 培地においては、PS 培地に対して#27(P< 0.05)の有意な減少が見られたが、#40(P< 0.05)、#105(P< 0.05)、#138(P< 0.05)の 3 種の同族体では有意な分解率の低下が観察された。GB0.5 培養物と L 培養物に対する GB2.0 培養物と GB0.05 培養物の PCB 分解活性の違いは、クラスター解析でも明らかとされた(Fig. 4-1)。これらの結果から、GB0.5 培地で獲得した PCB 分解活性は、GB0.5 培地と L 培地の 2 種類の液体培地においてのみ継代維持できることがわかった。

Table 4-2 Effects of particle seize on the total residual PCBs in second transferred cultures from GB0.5 culture

Conditions	L	GB2.0	GB0.5	GB0.05
Material/Particle size	Non	GB/2.0	GB/0.5	GB/0.05
Residual amount (weight%)[a]	76.2%±5.6%	85.3%±4.7%***	66.3%±3.4%	97.0%±3.8%***

Abbreviations, PS; paddy soil, L; liquid, GB; glass beads. The condition names were explained in materials and methods. The experiments were performed more than triplicate. [a] Significant decrease in the total residual weight% was compared with GB0.5 culture by analysis of variance (F-test) followed by a Scheffe multiple comparison test. The symbol *** denote the significant differences at less than 0.1% of probability, respectively
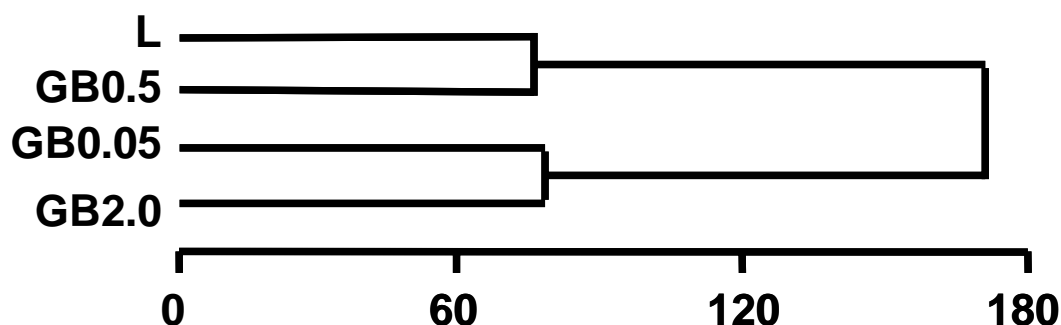
Fig. 4-1 Dendrogram from the cluster analysis grouping the DGGE samples of soil-free cultures after incubated in GB0.5 culture using Ward method normalized data

The scare was corresponded to squared distance.

Analysis was referred from http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.cgi

4.3.3 GB0.5 培地における PCB 分解活性の長期継代維持とその活性

GB0.5 培地を用いて、PS 培養物の PCB 分解活性を有する液体培養物の継代培養を行い、3 年以上、15 継代培養に成功した。分解活性維持方法は、第 2 章で決定した方法と同様に、接種率 5%、56 日間隔とした。GB0.5 培養物の全 PCB 残留率は、殺菌コントロール培養物と比較して 58.4±12.0 mol%(P< 0.01)で、平均脱塩素化率は、39.0±10.7 mol%(P<0.01)であった。この値は、第 3 章で獲得した BS 培養物と同等の全 PCB 減少率であった。

56 日培養後の GB0.5 培地継代培養物における各 PCB 同族体別の分解率について、第 3 章における PS 培養物との有意差検定結果を Table 4-3 に示した。PS 培養物と比較すると、#52/#69 では継代培養間のばらつきが大きく、#6 および#18 の蓄積がみられたが、これらの同族体における有意差は得られなかった。また、#103(P< 0.01)以外に、PS 培養物よりも有意に

Table 4-3 Average residual amount of individual PCB congeners (mol%) in GB cultures after 56 days of incubation during the maintenance of the anaerobic PCB-degrading activity over 15 times of the serial transfers

IUPAC number	Substituted positions of Cl	mol % in initial PCB mixture	GB 0.5			Significant difference
			Residual amount	±	SD	
6	2-3	0.6	104.7	±	112.9	
8	2-4	4.5	38.8	±	15.9	***
16	23-2	0.3	63.1	±	18.8	**
20/33/45	23-3/34-2/236-2	7.9	57.6	±	15.9	***
17	24-2	2.8	50.0	±	14.5	***
28/53	24-4/25-26	10.1	51.2	±	16.0	***
18	25-2	7.7	70.3	±	40.4	
26/50	25-3/246-2	1.3	55.9	±	14.6	***
31	25-4	9.6	58.8	±	16.6	***
32	26-4	2.0	55.2	±	23.8	***
44	23-25	6.1	71.3	±	19.2	*
46	23-26	3.2	72.2	±	16.8	*
49/43	24-25/235-2	4.2	64.8	±	22.1	**
66	24-34	5.8	70.5	±	11.0	**
52/69	25-25/246-3	6.6	79.0	±	22.7	
70	25-34	7.0	69.1	±	8.6	***
72/64	25-35/236-4	3.4	65.7	±	18.3	**
41	234-2	0.8	69.9	±	23.4	*
74/95	245-4	3.9	73.8	±	13.9	*
110	236-34	2.6	83.9	±	6.6	
105	234-34	1.2	78.8	±	17.3	
97/117/86	245-23/2356-4/2345-2	1.1	75.2	±	18.7	
101/150	245-25/236-246	3.1	76.1	±	12.0	
118	245-34	1.9	76.3	±	9.7	
103/71	246-25/26-34	1.2	69.2	±	16.0	**
138	234-245	0.3	83.6	±	16.2	
136	236-236	0.2	70.5	±	26.8	
149/77	236-245/34-34	0.2	79.7	±	14.3	
176	2346-236	0.2	76.7	±	12.0	
Total		100.0	58.4	±	12.0	***

GB: glass beads, SD: standard deviation The residual amounts are expressed as mol% of the sterile control. The values are the averages after 56 days of incubation for 15 times of the serial transfers during the maintenance of the anaerobic PCB-degrading activity. Significant difference in the residual mol% of each PCB congener was compared between GB and PS cultures by an Aspin-Welch test. The symbols *, **, and *** denote the significant differences at less than 5%, 1% and 0.1% of probability, respectively.

分解した 5 塩素化以上の高塩素同族体はなかった。また、PS 培養物でみられた#6, #17 及び#32 の蓄積傾向とは異なり、#6 および#18 の蓄積傾向が見られた。一方、第 3 章で獲得した BS 培養物と比較した各同族体別の残留率は、#17、#26/#50 および#32 では 10%程度高い値を示したが、#46、#66、#70 および#74 では、10%程度低い値を示した。これらを除く 3 塩素化、4 塩素化同族体は、BS 培養物とほぼ同等の有意な分解率を示した。これらの結果から、本 GB0.5 培養物において、PS 培養物で得られた幅広い PCB 同族体に対する分解活性と比較すると、主に 3 塩素化、4 塩素化同族体の分解率を飛躍的に向上した。この活性は、BS 培養物とは異なる嫌気的 PCB 高分解活性であることが示された。

4.3.4 FISH 法による *Archaea*/*Bacteria* の存在割合

各種液体培養物について、*Bacteria* をターゲットとしたプローブ EUB338mix、および *Archaea* をターゲットとしたプローブ ARC915 を用いて FISH を行い、その微生物存在割合を求めた(Table 4-4)。また、*Bacteria*(EUB338mix)および *Archaea*(ARC915)の FISH 画像を Fig. 4-2 と Fig. 4-3 に示した。しかしながら、複数回実験を行った結果からは、粒径サイズと、その微生物存在割合に相関は見られなかった。微生物総菌数は、GB0.05 培養物では、10^6 以下であったが、それ以外の液体培養物では、全て 10^8 オーダーであり、違いはみられなかった。

Table 4-4 Effects of particle seize on the abundance ratio of *Bacteria* and *Archaea*

Conditions	L	GB2.0	GB0.5	GB0.05
Bacteria (EUB388mix)	35.5%	66.2%	44.5%	61.9%
Archaea (ARC915)	33.5%	39.2%	44.1%	35.4%

The percentage value was calculated compared with the total numbers of microorganisms in each optical area. Abbreviations, PS; paddy soil, L; liquid, GB; glass beads The condition names were explained in materials and methods. The experiments were performed more than triplicate.

4.3.5 液体培養物中の微生物群集構造解析

各種液体培養物中の微生物群集に関して、*Bacteria* および *Archaea* における 16S rRNA 遺伝子断片の DGGE バンドパターンを 4 継代まで比較した(Fig. 4-4, Fig. 4-5)。培地条件による違いは、*Archaea* をターゲットとした DGGE バンドパターンではみられなかったが、*Bacteria* をターゲットとした DGGE バンドパターンは、顕著であった。この *Bacteria* の DGGE バンドパターンを、クラスター解析したところ、PS 培養物と液体培養物で大きくクラスターが分かれ、さらに GB0.05 培養物とそれ以外の液体培養物でクラスターが分かれた(Fig. 4-6)。この結果から、液体培養物では GB 粒径 0.5 以上の培地で、その群集構造が大きく影響を受けることが示唆された。ただし、この群集構造変化と全 PCB 分解率には直接的な相関は見られなかった。
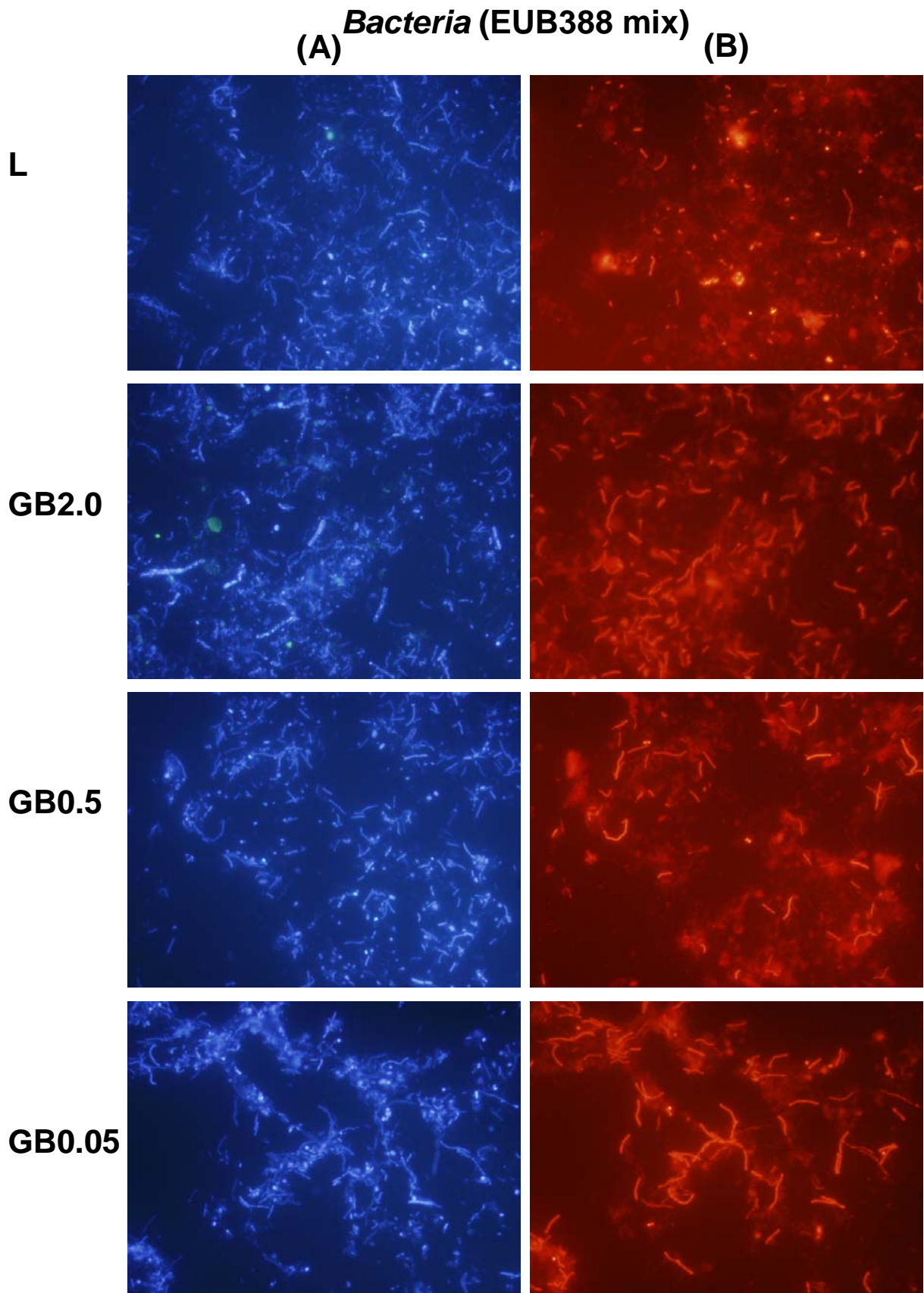
Fig. 4-2 Fluorescent in situ hybridization of *Bacteria* using Cye 3 labeled EUB338

DAPI image (A) and Cye 3 image (B) of of EUB 338mix probe hybridized cell.
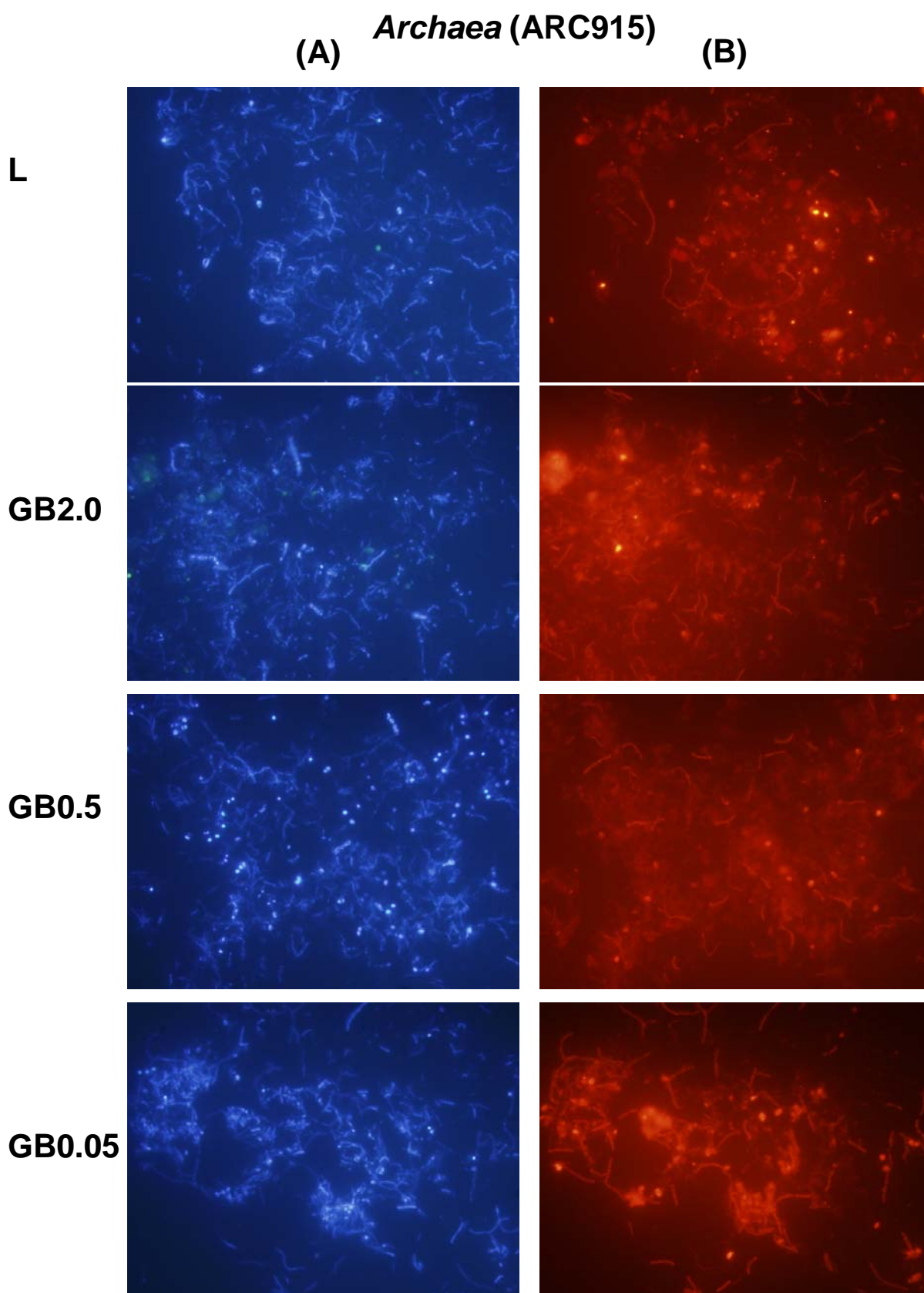
Fig. 4-3 Fluorescent in situ hybridization of *Archea* using Cye 3 labeled ARC915 probe

DAPI image (A) and Cye 3 image (B) of of ARC915 probe hybridized cell.
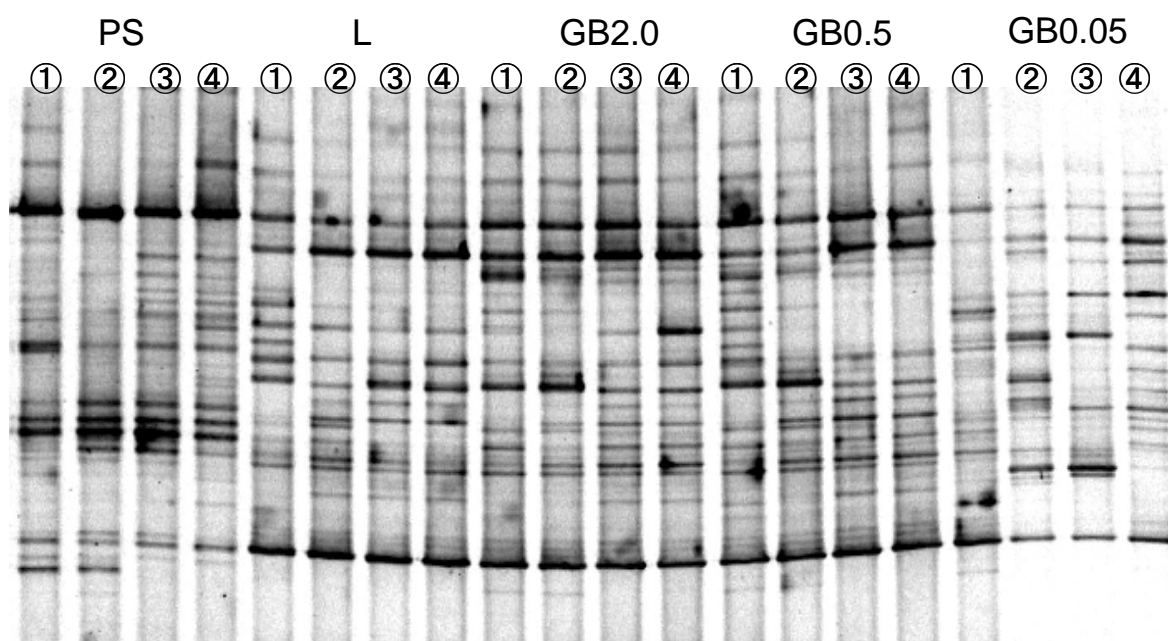
Fig. 4-4 The DGGE fragment patterns of the amplified 16S rRNA genes for *Bacteria* from microcosms of serial transferred cultures for 5 types of medium after 56 days of incubation

The numbers in circle corresponded to the times of serial transfer on individual cultures. Five types of medium were abbreviated as PS, L, GB2.0, GB0.5 and GB0.05, which are described in materials and methods of this chapter detail. The band patterns in individual cultures were analyzed by cluster-analysis and indicated on Fig. 4-4.
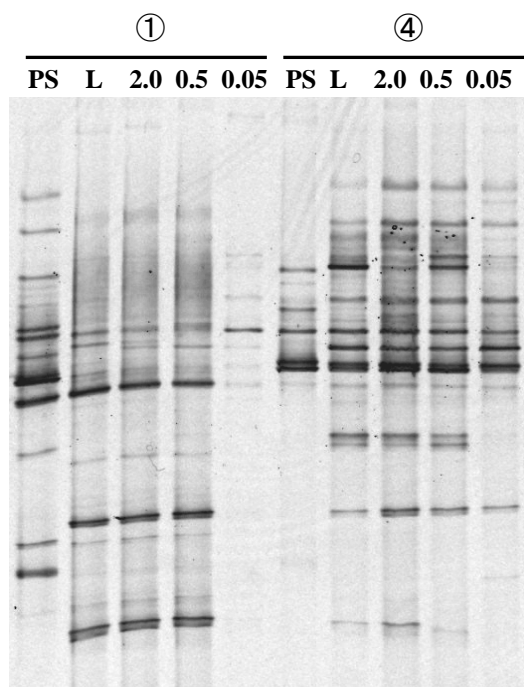
Fig. 4-5 The DGGE fragment patterns of the amplified 16S rRNA genes for *Archaea* on serial transferred cultures for 5 types of medium after 56 days of incubation

The numbers in circle corresponded to the times of serial transfer on individual cultures. Five types of medium were abbreviated as PS, L, GB2.0, GB0.5 and GB0.05, which are described in materials and methods of this chapter detail.
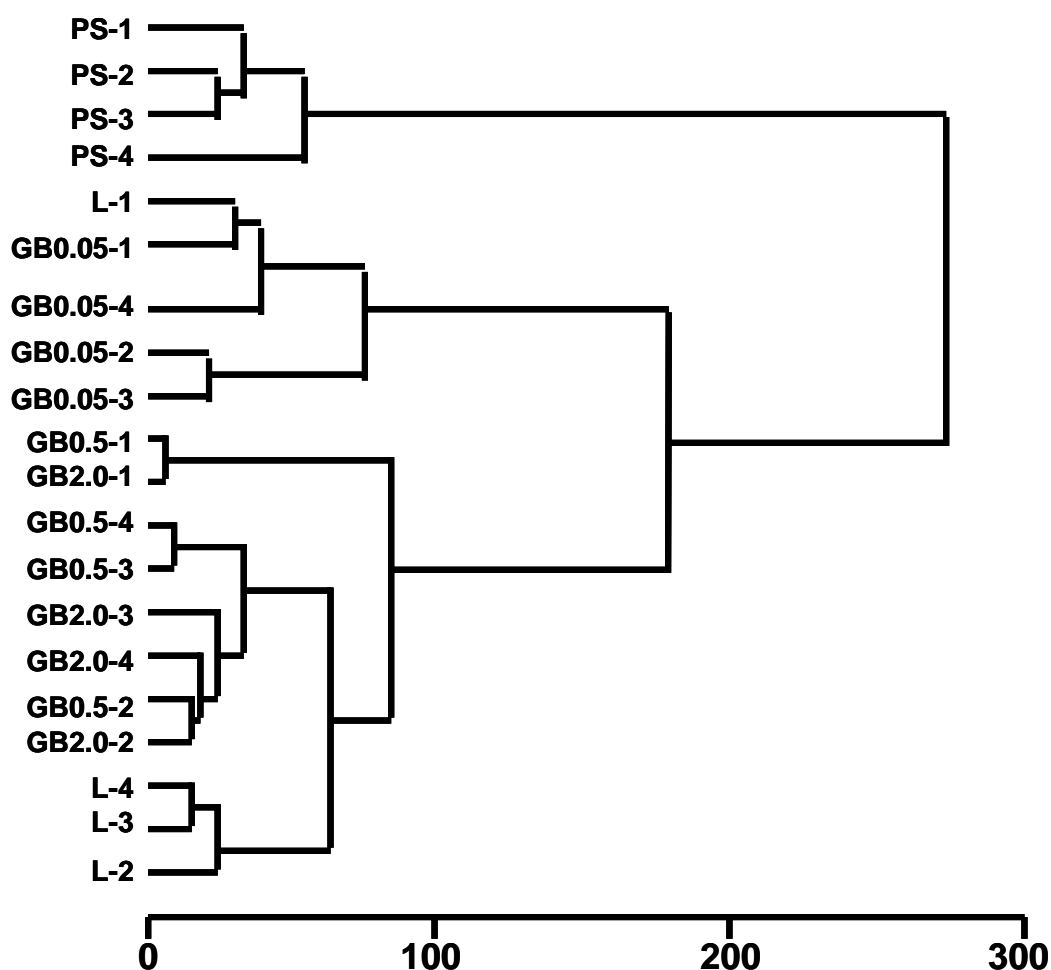
Fig. 4-6 Dendrogram from the cluster analysis grouping the DGGE samples of soil-free cultures on serial transferred cultures from PS culture using Ward method normalized data

The numbers with the name of the individual cultures were corresponded to the times of serial transfer. The scare was corresponded to squared distance. Analysis was referred from http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.cgi

長期継代培養に成功した GB0.5 培養物における微生物群集構造を、PCR-DGGE 法と呼吸鎖キノン解析法を併用して解析した。GB0.5 培養物中に含まれているキノン種は、2.65 μmol のメナキノン-7(H2)のみで、それ以外のキノン種は検出限界以下であった(0.02 nmol in the culture)。メナキノン-7(H2)は、嫌気性微生物では *Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱および *Epsilonproteobacteria* 綱に分類された(Katayama and Fujie, 2000)。また、*Bacteria/Archaea* をターゲットとした PCR-DGGE バンドパターンも、比較対象とした PS 培養物とは異なっていた(Fig. 4-7)。DGGE バンドのクローニング解析により、これらの優占化バンドが *Firmicutes* 門と *Deltaproteobacteria* 綱に分類された(Table 4-5)。これらの優占化バンドの違いが PCB 分解活性の向上と相関があるものと考えられる。
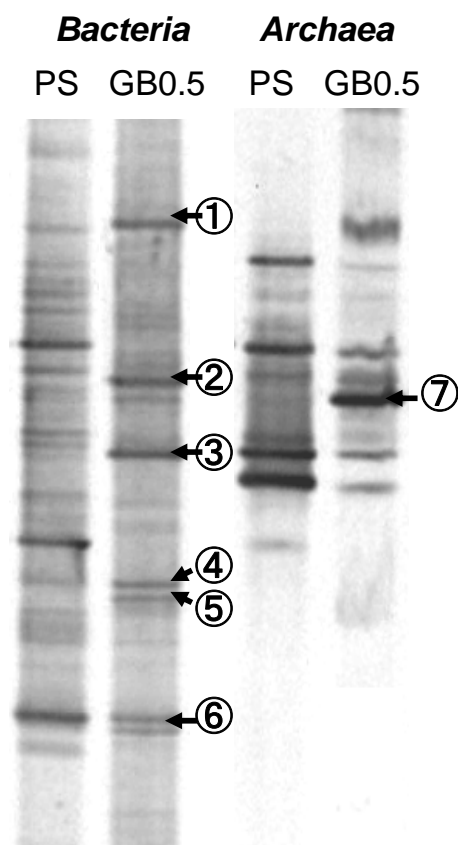
Fig. 4-7 The DGGE fragment patterns of the amplified 16S rRNA genes for *Bacteria* and *Archaea* from microcosms of the two cultures after 56 days of incubation

Abbreviation PS and GB0.5 are corresponded to the paddy soil (PS) culture developed in chapter 2 and the glass beads 0.5 mm culture. The bands numbered in circles were subjected to the DNA sequencing and the phylogenetic analysis as shown in Table 4-5.

Table 4-5 Phylogenetic assignment of the DGGE clones of partial 16S rRNA genes isolated from the microcosm in the BS culture

Band*	Phylum/class	Closest relative	Accession No.	Similarity (%)
1	*Gammaproteobacteria*	*Pseudomonas* sp. SBW25	AY45712	100
2	*Bacteroidetes*	Uncultured bacterium BTSE-T2 1F from TCE-dechlorinating consortia	AY217446	99
3	*Firmicutes*	*Acetanaeobacter thermotolerans*	AF358114	99
4	*Firmicutes*	*Clostridium glycolicum* strain EIB4	AY458856	99
5	*Firmicutes*	*Sedimentbacter hongkongensis* strain KI	AY571338	98
6	*Chloroflexi*	Uncultured *Chloroflexi* bacterium sp.	AY921709	99
7	*Methanomicrobia*	*Methanoculleus palmolei*	Y16382	99

* The band numbers correspond to those shown in circle in Fig. 4-7.

15 回継代した GB0.5 培養物について、既知の脱塩素化微生物の 16S rRNA 遺伝子断片の特異的検出を行ったところ、*Dehalococcides* 属近縁菌は、15 継代中 3 回、*Desulfitobacterium* 属近縁菌は 10 回、*Dehalobacter* 属近縁菌は、6 回それぞれ検出された。しかしながら、PCB 分解活性とこれらの脱塩素化菌の検出に相関は見られなかった。

4.3.6 PCB 分解活性制御因子の検討

液体培地(GB0.5 培地)は、GB 以外に培地成分しか含まれないために、PCB 分解活性に対する培地成分の影響を評価することが可能である。GB0.5 培地における電子供与体、電子受容体を比較検討したところ、AL 培地をベースとした場合、酢酸塩を電子供与体として含んでいる場合に 10%以上の有意な PCB 残留率の減少が見られた(Table 4-6)。ただし、水素添加培養物では、有意な分解はみられなかった。一方、SF 培地をベースとした場合は、いずれの条件でも有意な分解はみられなかった。次に、阻害剤および熱処理による影響は、いずれの条件でも有意ではなかった。また、PCB 単一同族体#61 のみを電子受容体として添加した場合も、有意な脱塩素活性は確認されなかった。現段階では、GB0.5 培養物における分解活性制御因子は特定できなかった。

Table 4-6 Effects of electron donors, inhibitors and electron acceptor in two different medium on GB0.5 culture

		AL medium	SF medium
Electron donors	Acetate	++	-
	Formate	+	-
	Lactate	+	-
	Pyrvate	+	-
	Acetate+H_2	-	-
	Acetate/Lactate	++	-
Inhibitors[a]	Heat treatment	++	+
	Molybdate	++	+
	BES	++	+
Electron acceptor[a]	#61	-	-

Symbol marks corresponded to the activity compared with the PS culture; -: <1%, +:<5%, ++: >10% increased. The components of AL and SF medium were described on materials and methods on chapter 2 and 3. BES is abbreviation of 2-bromoethane sulfonic acid. Effects of inhibitors and electron acceptors were performed on GB0.5 culture amended with acetate/lactate as electron donors.

4.3.7 液体培養物中の最高分解活性

GB0.5 培地における AL 培地再添加培養物中の全 PCB 残留率は、23.1%±5.8% (w/w) (25.7±6.2 mol%)であった。これは、絶対量換算で約 75 μg の全 PCB 混合物を分解したことを意味している。この培養物における各同族体別の残留量とその分解パターンを Fig.4-8 に示した。添加した PCB 混合物のほとんどの PCB 同族体が減少したが、#6、#8、#17、および#18 について蓄積がみられた。この結果から、GB0.5 培養物における PCB 残留物は、AL 培地を再添加したことによって大部分分解することが示された。
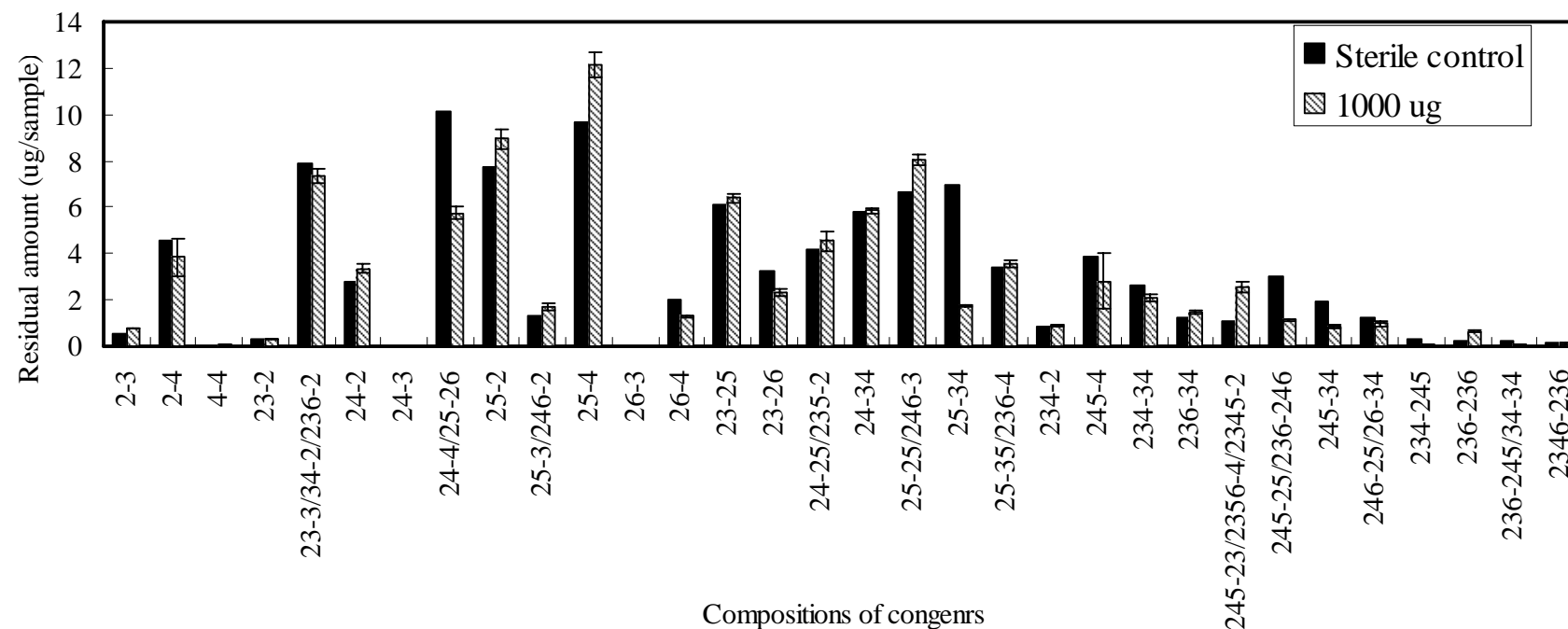
Fig. 4-8 The residual amounts of the PCB congeners in the GB0.5 culture amended with 15 ml of AL medium after 3 months of incubation and incubated for 56 days

The residual amounts of individual congeners were compared with the sterilized culture. Numbers indicated under the figure correspond to the structure of individual PCB congeners.
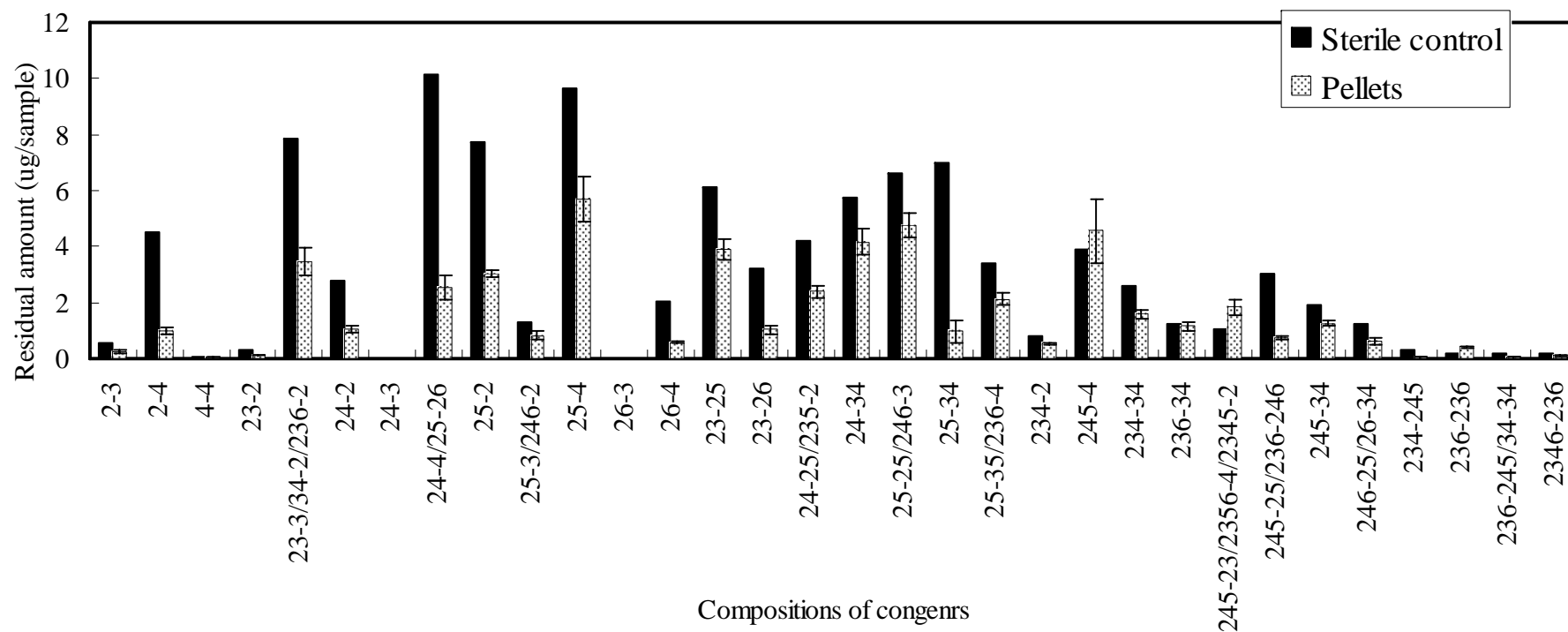
Fig. 4-9 The residual amounts of the PCB congeners in the GB0.5 culture amended with 1000 μg of PCB mixture and 15 ml of AL medium after 3 months of incubation and incubated for 56 days

The residual amounts of individual congeners were compared with the sterilized culture. Numbers indicated under the figure correspond to the structure of individual PCB congener

また、GB0.5 培養物に AL 培地を再添加する際に、通常の 10 倍の PCB 量を添加し、56 日培養した場合、全 PCB 残留率は 94.0%±2.9% (w/w) (95.5±2.9 mol%)であった。この残留割合は、他の GB0.5 培地で得られた割合に比べて小さいが、絶対量換算した場合は、約 60 μg の全 PCB 混合物が分解したことを意味している。また、本分解活性の各同族体別の残留量とその分解パターンから、脱塩素活性が示唆された(Fig. 4-9)。

4.4 考察

本章では、PS 培養物を接種源とした液体培養物の獲得に成功した。液体培養物は、固形物を一切含まない L 培地への直接継代では、獲得できなかった。GB0.5 培地を使用した場合は、分解活性の継代維持率が高く、液体培養物の獲得に成功した。また、一度 GB0.5 培地へ接種・培養した後に、GB0.5 培地および L 培地へ継代した場合は、その分解活性を維持・向上できた。一方、GB0.05 培地では、直接継代時も GB0.5 培地接種後の間接継代時も、分解活性は維持できなかった。GB2.0 培地も、いずれの継代方法においても、獲得成功率にばらつきがみられたため、液体培養物の獲得には不向きであった。一方、全 PCB 残留率のみを評価した場合、特徴的な脱塩素活性を見落とす可能性があったため、各培養物において各 PCB 同族体別に有意差検定を行った。しかしながら、いくつかの同族体について分解率の有意な変化がみられたが、ある種の同族体の著しい減少や蓄積はみられず、特徴的な脱塩素活性は確認できなかった。

GB0.5 培地における液体培養物は、接種率 5%、56 日間隔の継代によって、3 年以上にわたり分解活性を維持した。殺菌コントロール培養物と比較した全 PCB 残留率は、第 3 章で獲得した BS 培養物の高分解活性と同等の値を示した。しかしながら、各 PCB 同族体別の残留率について、PS 培養物の分解率よりも有意な分解がみられた 5 塩素化以上の高塩素同族体は 1 種類だけであった。BS 培養物における分解活性と比較すると、3 塩素化同族体の分解率は向上し、4 塩素化同族体の分解率は低下した。これらの結果から、本 GB0.5 培養物は、KC-300/400 混合物に含まれる PCB 同族体中の幅広い PCB 同族体について、5 塩素化同族体の分解率は PS 培養物と同等の分解活性しか得られなかったが、3 塩素化、4 塩素化同族体のうち特に 3 塩素化同族体に対する高い分解能を有していることが示唆された。GB0.5 培養物は、第 3 章で述べた BS 培養物と同じ PS 培養物を接種源としているが、全 PCB 分解率の向上は確認されたが、その分解活性は異なることが示された。この違いもまた、培地中の固形物の違いによる影響である可能性が示唆された。

PCB 混合物の分解活性の向上は、第 3 章で述べたように、有機物含有率による PCB 吸着率の違い画もたらす PCB の微生物利用効率の違いであると考えている。本章で培地として使用した GB は無機材料であり有機物を含まないため、PCB 吸着率が低く、PCB の微生物利用効率が向上していることが考えられる。しかしながら、本研究では、同一材料で作られた GB であっても、その粒径の違いによる分解活性への影響がみられた。よって、PCB 分解活性の向上は、PCB の微生物利用効率の向上だけでは説明できない。一方、GB 培地中では最密充

填率が異なるため、水分活性の違いから、培地成分中の栄養分子拡散が律速されている可能性もある。しかし、分子拡散を気にする必要のない L 培地においても、直接継代および GB0.5 培養物からの継代の違いによって分解活性への影響がみられた。これらの現象から、PCB 分解微生物にとって、その分解活性を発揮するための最適生息空間が存在する可能性が示唆された。特に、GB0.5 培地を用いた場合にのみ、分解活性の継代維持に成功し、一度継代維持に成功した分解活性は、GB 粒径が 0.5 mm 以上の培地において継代維持が可能であった。また、この微生物群集構造およびその分解化成は、液体培地間では類似していた。そのため、現段階では、GB0.5 培地が形成する空間(間隙)が、微生物群集の選抜に必要かつ適当なサイズであると考えられた。

各粒径の液体培養物の *Bacteria*/*Archaea* の存在割合と粒径について、FISH 法による予備実験では、粒径の小さいほど Archaea の割合が高くなるという結果(GB0.05 培地で *Archaea* 80.0%、*Bacteria* 17.6%)が得られていたが、相関はみられなかった。ただし、微生物の形態は、GB 粒径が大きくなるほど長桿菌の存在割合が高くなることが観察された。また、PCR-DGGE バンドパターンにおけるクラスター解析結果から、特に液体培養物は、GB 粒径 0.5 mm 培地の使用を境に微生物群集構造が大きく影響を受けることが示唆された。この群集構造変化と全 PCB 分解率には直接的な相関は得られなかった。

長期継代培養に成功した GB0.5 培養物の微生物群集構造は、呼吸鎖キノン解析および PCR-DGGE 解析により、*Firmicutes* 門、*Deltaproteobacteria* 綱の微生物種が優占化していることがわかった。また、本培養物においても、既知の脱塩素化微生物の 16S rRNA 遺伝子断片の特異的検出結果と PCB 分解活性に相関はなかったが、GB0.5 培養物において、PS 培養物や BS 培養物中で検出された *Chloroflexi* 門の微生物種も検出された。このときの微生物群集は、その DGGE バンドパターンから、PS 培養物とも BS 培養物とも異なることが示された。いずれの微生物群集においても *Firmicutes* 門の微生物種が優占化していることから、*Firmicutes* 門に属する発酵性微生物による有機酸生成や水素生成による電子供与体の継続的供給が PCB 混合物に分解活性には重要であることが考えられた。他の PCB 脱塩素化微生物群集においても、*Firmicutes* 門の微生物種が高頻度に検出された(Yan et al., 2004, Bedard e al., 2006)。

GB 培地を用いて、PCB 混合物分解活性における分解活性制御因子を追及したところ、GB0.5 培養物は、酢酸を電子受容体もしくは炭素源として PCB 混合物の分解活性を維持していることが示唆された。本培養物では、*Firmicutes* 門の微生物種による発酵反応由来の低分圧水素生成が可能性である。しかし、水素添加培養物では、分解活性の低下がみられた。これは、水素分圧が高すぎたために起こった阻害であると考えられる(Sokol et al., 1994, Rysavy et al., 2005)。一方、硫酸塩を含まない SF 培地を用いたにも関わらず、硫酸塩の影響ははっきりしなかった。これは、SF 培地の培地組成が、AL 培地と全く異なるために、微量原子変化分解が活性に影響した可能性もある。また、液体培養物における PCB 分解活性に、硫酸塩の存在が必要であると考えることもできる。GB0.5 培養物における分解活性は、3 塩素化以下

の低塩素化同族体の分解率が高いことから、一部の低塩素化同族体の蓄積と硫酸還元細菌の関係も示唆された結果(第 3 章)を考慮した場合、硫酸塩を電子受容体として利用した PCB の嫌気的酸化分解微生物が存在する可能性も否定できない。そのために、SF 培地では、電子受容体としては PCB しか存在せず、高塩素化 PCB 脱塩素活性の弱い GB0.5 培養物では、その分解を進行させせることができなかったと考えることができる。

一方、GB0.5 培養物では、阻害剤添加による影響がみられなかった。特に、硫酸還元細菌阻害剤を添加した GB0.5 培養物では、硫酸還元細菌が生育阻害されているにも関わらず、PCB 分解活性に影響しなかったことから、硫酸還元細菌と PCB 分解菌を区別する必要性ある。ただし、BES 非感受性や、熱耐性の結果からは、*Firmicutes* 門の集積結果との一致がみられた。

単一 PCB 同族体の分解は、脱塩素活性に関する多くの研究報告がなされている(Cutter et al., 2001, Wu et al., 2002, Natarjan et al., 1998, Yan et al., 2005)。これまでに、PS 培養物中において、#16, #37, #180, #199 の 4 種の同族体に対して、それぞれ嫌気分解試験を行ったが、有意な結果は得られなかった。GB0.5 培養物は、PCB 混合物に対する高い分解活性を有するが、現段階では脱塩素活性を示唆するデータが一度得られたのみで、再現性が得られていない。#61 は、ビフェニル骨格の片側にのみ塩素原子が付加した構造であるため、PCB 混合物中に類似した構造をもつ同族体が存在せず、分解されなかった可能性がある。これらの結果から、各同族体別に分解微生物が存在する可能性が示された一方で、単一同族体で得られた活性を、PCB 混合物分解活性へ応用することは、困難であることが示唆された。また、本培養物における PCB 分解活性は、PCB 混合物が存在する条件でのみ分解活性を示す共代謝による可能性も示唆された。

GB は、無極性の無機材料であるため、溶出分等の因子を考える必要のない担体であるため、活性向上因子の特定に適していると考えた。しかしながら、いずれの結果も、現段階では各条件への継代 1 代目の結果であるために、明らかな結果は示されなかった。今後の継代培養による分解活性律速因子の解明が期待される。

GB0.5 培地における最高分解活性は、3 ヶ月培養物に AL 培地を再添加し 56 日培養した時点で獲得できた。AL 培地の再添加により、培養物全体における PCB 濃度は希釈されたことになるが、その結果、添加した 100 μg の PCB 混合物のうち 75%を分解した。また、脱塩素化産物と考えられる一部の低塩素化同族体の蓄積を除いて、PCB 混合物中のほとんどの同族体が減少した。さらに、通常の 10 倍の PCB 混合物量に対しても、絶対量で約 60 μg の PCB 混合物が分解された。この結果から、本培養物の分解能力は、PCB 濃度に関係なく、培養物の有する分解活性に律速されることが示唆された。

本章で得られた知見は、第 3 章で試験した微生物資材化への重要な基礎知見となることが期待される。今後、分解活性の更なる向上を目指して、供給すべき栄養源を特定し、微生物最適生息場の解明が期待される。

第 5 章 総括

5.1 総合考察

これまでに、水田土壌中における PCB の分解活性は明示されていなかったが、本研究は、PCB 汚染履歴のない水田土壌由来の微生物群に PCB 混合物の嫌気的分解活性を見出した初めての報告である。また、本研究室において、同一の水田土壌を使用して、PCP (Yoshida et al., submitted)や Fthalide (Yoshida et al., unpublished)等の芳香族有機塩素化合物や、環境ホルモン様作用が問題視されているアルキルフェノール類(Shibata et al., 2006)に関しても、その嫌気的分解活性が確認された。よって、本水田土壌は、これらの難分解性物質に対する分解能を有していることが示唆された。

本研究で対象とした PCB 混合物は、市販品の KC-300/400 を 1:1 で混合したものである。この PCB 混合物に含まれる同族体は、それぞれ含有率が異なり、分析上 42 もしくは 44 種類に分けることができた。PCB 混合物において、ある PCB 同族体が 1 塩素脱塩素化され、次にその脱塩素化物がさらに脱塩素化されるような逐次反応が起こっている場合、脱塩素化経路を追跡することはとても困難である。実際に、各培養物に対して、経時変化をモニタリングすると、一時的に蓄積傾向が見られる同族体が存在したが、各同族体別に脱塩素化速度を把握することは非常に困難であった。よって、本研究における分解活性は、数多くの培養条件を検討し、各分解活性を継代維持するために設定した培養期間 56 日を基準に、同族体別の残留量の増減から、脱塩素活性を含めた分解と定義した。

本研究でみられた PCB の減少は、PCB 同族体やその分解産物が、微生物細胞内および微生物由来の細胞外基質に非特異的もしくは特異的に取り込まれた可能性(Choi et al., 2003)も考えられた。しかしながら、培養物中の PCB 残留量分析は、有機溶媒による全サンプル量抽出を行っていることから、細胞内外の PCB 等の非極性物質も抽出されているはずである(第 2 章)。そのため、各実験条件で得られた回収率は、容器の移し替え等の操作上のロスが含まれていると考えるのが適当であり、培養期間中に PCB の細胞吸着があったとしても、それによる残留率の減少は考えにくい。また、培養物における非生物学的脱塩素化及び分解の可能性(Garbarini and Lion, 1986, Voice and Weber, 1983, Lee and Batchelor, 2004)に関しても、培養物中の残留率は、殺菌コントロール培養物中での残留率との有意差比較を行っているため、考えにくい。これらの結果から、本培養物中で得られた PCB の減少は、微生物分解によるものと判断した。

本培養物の課題は、脱塩素化物および分解産物となる 1 塩素化同族体やビフェニル、およびその代謝産物の特定ができていないために、減少した PCB の代謝経路が全く未知である点である。この点を解消するためには、単一同族体について脱塩素化活性を確認することも重要である。また、PCB 混合物の脱塩素活性を評価するためには、定量性を求めた全量抽出ではなく、同一培養物を用いた経時的な部分サンプリングによる定性的な脱塩素化パターン比較を繰り返し証明することも必要である。さらに標識 PCB を利用することで、嫌気開環分解

活性を確認できる可能性もある。一方、単一同族体で集積をかけた培養物では、その脱塩素化産物の蓄積により脱塩素活性を確認しているため、逆にいえば、蓄積した脱塩素化同族体に対する脱塩素化活性が低いことを同時に述べていることになる (Cutter et al., 2001, Wu et al., 2002, Natarjan et al., 1998, Yan et al., 2005, Yoshida et al., submitted.)。そのため、本培養物のような広範囲の PCB 同族体に対する同時分解活性を獲得するためには、PCB 混合物を添加し継代培養することに有意性があると考えられる。

第 2 章で獲得した PS 培養物では、42 種の同族体中 39 種の同族体で有意な分解活性が観察された。その平均全 PCB 分解量は、継代培養物中において 13.9 mol% (約 14 μg)であった。次に、培養条件を変化した BS 培養物では、その平均全 PCB 分解量は、39.7 mol% (約 40 μg)であり PS 培養物よりも高い分解活性を示した。また、各同族体別についても、44 同族体中 39 種の同族体に対して PS 培養物よりも有意な分解活性が観察された。一方、GB0.5 培地で獲得した平均全 PCB 分解量は、41.6 mol% (約 40 μg)であったが、その分解率は、3 塩素化物、 4 塩素化物で向上したが、同 PS 培養物に対する有意な分解がみられた同族体は、25 種にとどまった。これらの結果から、BS 培養物と GB0.5 培養物において、PS 培養物で獲得した PCB 分解活性を異なる活性を強化したことを意味している。

PS 培養物や GB0.5 培養物では、2 塩素化、3 塩素化同族体の一部に、硫酸還元細菌阻害剤添加した BS 培養物では、通常検出限界未満の PCB 同族体 2 種類にそれぞれ顕著な蓄積傾向がみられた。これらの蓄積傾向から、各培養物でみられた分解活性に脱塩素活性を含んでいることを示唆された。脱塩素活性の場合は、高塩素化合物と脱塩素化によって蓄積した低塩素化合物の量的相関がとられているはずである。しかしながら、本研究で獲得した各培養物における分解活性では、その量的相関は得られなかった。特に BS 培養物では、低塩素化同族体の蓄積はみられなかった。Natarajan ら(1996)は、低塩素化同族体の脱塩素化は、高塩素化同族体の脱塩素化速度よりも早いことを報告している。これらのことから、各培養物中で得られた嫌気的 PCB 混合物分解活性には、低塩素化物の更なる脱塩素化もしくは、これまで報告例のない嫌気的 PCB 分解(開環反応)の可能性も含んだ分解活性であると期待できる。脱塩素パターンについては、Brown ら(1987)が最初にあらゆる PCB 脱塩素パターンを系統化予測しており、*meta* 開裂、*para* 開裂の組み合わせにより少なくとも 8 つのパターンがあると述べている。特に分解対象とする PCB 同族体の種類を制限した場合、その脱塩素化物が確認しやすいことから、Bedard らと中心に、各脱塩素化活性をパターン化して提言している(Bedard et al., 1996, 1997, 2006, Bedard and Quensen, 1995)。本研究では、阻害剤添加 BS 培養物で得られた PCB 同族体の増減結果から、一部の同族体について、脱塩素経路を予測した(第 3 章参照)。本研究で得られた培養物は、実際に *meta* 位、*para* 位に塩素が付加した同族体のみならず、これまで報告例の少ない *ortho* 位塩素化同族体についても、その分解活性が確認できており、分解スペクトルが広く、特異性が小さいと考えられる。広範囲な PCB 同族体に対する分解活性を欠損させることなく、長期継代維持に成功した報告例は、非常に少なく知り得る限り Natarjan ら(1996)のグラニュールおよび、Bedard ら(2006)の液体培養物のみである。本研

究で得られた最高分解活性は、これらの研究者らと同等であり、十分に拮抗するレベルの活性であった(第 3 章参照)。

本研究では、PS 培地のみならず BS 培地や液体培地を用いて、3 年にもわたり、PCB 混合物の分解活性の継代培養に成功した。PCB 分解活性の継代維持は、継代ごとに堆積物などの固形物量を低減することで、最終的に固形物を含まない液体培養物の獲得が報告されている(Boyle et al., 1993, Hartcamp-commandeur, 1996, Cutter et al., 1998, 2001, Wu et al., 1998, 2002, Bedard et al., 2006)。また、Natarajan ら(1996, 1998)は、グラニュールを用いて PCB 脱塩素活性を維持している。しかしながら、これらの報告例から、固形物を含まない培養物の獲得は非常に難しいことがわかっていた。第 2 章において、PS 培養物の分解活性の継代維持に成功した要因として、PS 培地が、微生物にとっての生息場を提供している可能性を考察した。事実、第 3 章において PS 培地を改変した BS 培地で、分解活性の飛躍的な向上がみられた。これは、BS の土壌種やその化学成分による影響ではなかったことから、分解活性を有意に向上させた BS 培養物における直接的な因子は突き止められなかった。しかしながら、液体培地への継代では、GB 粒径の違いおよび固形物の有無でその分解活性が影響を受ける可能性が示唆された。これらの結果から、本研究で得られた PCB 分解微生物群集は、培地成分の固形物に影響を受けることが示唆された。

本研究では、有機物を含まない固形物材料を培地に添加することで、PCB 混合物の分解率が顕著に増加することが示唆された。PCB の利用効率を向上するために、界面活性剤や GB を利用した報告(Fava, 1996)もあるが、PCB の微生物利用効率が PCB 分解活性のひとつの律速となっていることは事実である。有機物を含む PS 培地では、活性は安定維持できたが、培養条件に関係なく分解活性は小さかった。PCB は、同族体によってその疎水性にも違いがあるため、有機物の有無によって、その吸着率も異なっているはずである。また、PCB と微生物の接触効率を高める目的だけであれば、振とう培養によって解消されると考えられるが、PS 培養物や GB0.5 培養物の分解活性は、振とう培養では向上しなかった。これらの結果は、PCB の微生物利用効率の向上だけではなく、それ以外の未知の制御因子が存在していることを示唆している。この有力な未制御因子として、微生物群集構造の維持が考えられる。

微生物群集構造の維持には、微生物にとっての最適生息場が影響している可能性がある。本研究では、第 4 章で述べた粒径サイズ 0.5 mm の GB 培地が微生物群集担持空間としての重要な鍵を握っている可能性が示唆された。ただし、BS 培地における土壌粒子サイズの影響がなかった(第 3 章)理由は、GB 培地において PCB 分解活性への影響がみられた粒子サイズではなかったためと判断した。一方、PCB 分解活性との直接相関は得られなかったが、GB 粒径変化によって、微生物群集構造が大きく変化することも発見した。この現象は、好気条件下で同様の GB 培地を用いた基質利用性を評価した研究においても、微生物群集構造変化が観察されたことにも裏づけられる(清水, 2006)。現段階では、分解対象物質が PCB 混合物であることに加え、微生物群集も未だ多くの微生物種が混在すること、さらに実験のばらつきも大きいことから、PCB 混合物の分解活性微生物を安定的に維持できる生息空間の存在を示

唆することしかできなかった。微生物の最適生息空間について、PCB 分解活性で評価するためには、単一同族体を分解する、より純化の進んだ培養物を利用する必要がある。各微生物種についての最適生息空間が提言できれば、微生物培養法の新しい知見となる可能性があると期待される。

本研究では、PCB 混合物を分解対象としてきた。PCB は、同族体ごとに化学的性質が異なるために、各同族体別に分解微生物が存在する可能性も考えられる。そのため、獲得した微生物群集は、PCB 混合物を分解する微生物群集の集積物である。PS 培養物中の微生物群集構造は、*Firmicutes* 門の微生物種が優占化していた。また、*Chloroflexi* 門や *Deltaporteobacteria* 綱の微生物種も検出された。この傾向は、BS 培養物や GB0.5 培養物中の微生物群集構造でも同様であった。しかし、DGGE バンドパターン比較を行うと、各培養物中で優占化したバンドは異なっていた。BS 培養物では、特に *Frimicutes* 門と *Deltaporeteobacteria* 綱と *Chloroflexi* 門のバンドに優占化が見られた。GB0.5 培養物中では、*Firmicutes* 門と *Chloroflexi* 門のバンドの優占化が見られたが、*Deltaproteobacteria* 綱のバンドは検出されなかった。また、現段階では、この *Chloroflexi* 門の DGGE バンドの検出と、既知の脱塩素化菌の PCR による特異的検出との有意な相関は得られていないが、*Chloroflexi* 門の微生物種が検出された培養物では、全 PCB 残留率が比較的低減する場合が多いことも観察された。一方で、各培養物中でメタン生成が検出されたが、メタン生成古細菌と各 PCB 分解活性には直接的な相関はみられなかった。

AL 培地は、初期水田土壌培養物の中で一番高い活性が得られ培養物で用いた培地であり、継代培養活性を向上させるために、この培地で継代培養を行ってきた。全 PCB 量の高分解活性を有する BS 培養物は、酢酸・乳酸再添加によってその分解率がさらに向上した。特に酢酸塩の消費と微生物増殖に伴った PCB 分解活性がみられた。よって、BS 培養物の PCB 分解活性は、酢酸塩が炭素源および電子供与体であると考えた(第 3 章)。GB0.5 培養物中では、長期培養物に（酢酸塩・乳酸塩のみならず）AL 培地を再添加することで、74.3 mol% (約 75 μg) の PCB 混合物が分解された。現在 AL 培地組成から、活性制御因子を突き止める研究を進めているが、いずれの結果からも、PCB 混合物分解活性は AL 培地添加条件下で促進していることがわかった。

また、本 PCB 混合物分解微生物群集において、*Firmicutes* 門が優占化しているということは、発酵性微生物が優占化していることを意味している。発酵性微生物は、本研究で使用した AL 培地に含まれる酢酸塩や乳酸塩を用いて水素を生成し得る(Nath and Das, 2004)。一方、AL 培地は、硫酸塩も含んでいる。BS 培養物中では、硫酸塩の存在が、PCB 分解活性を阻害していると判断した。一方、本研究を通して、硫酸還元細菌が低塩素化同族体の分解（脱塩素活性を含む）に関与していることが示唆された。つまり、本培養物中における硫酸還元細菌の存在意義として、二つの可能性を考えることができる。一つ目は、硫酸還元細菌自身が、PCB の分解活性を担っている可能性である。しかしながら、硫酸還元細菌阻害剤の添加実験結果においても、分解活性は完全に消失していないことから、硫酸還元細菌が全ての PCB 混

合物の分解を行っているとは考えにくい。もう一方は、PCB 分解微生物が、硫酸還元細菌と水素利用において競合関係にある可能性がある。水素は、PCB を電子受容体とする脱塩素化微生物にとっての電子供与体となる一方、硫酸塩を電子受容体とする硫酸還元菌や、二酸化炭素を電子受容体とするメタン生成古細菌にとっても電子供与体となり得る(Madigan et al., 2004)。本培養物の場合、メタン生成古細菌は PCB 分解活性に大きな影響はなかったが、①硫酸塩存在下では、硫酸還元細菌が水素を消費して硫酸を電子受容体として利用するためにPCB 分解活性が低下し、②硫酸塩枯渇状態もしくは非存在下では、PCB 脱塩素化微生物が利用できる水素分圧が上がるために、硫酸還元菌の代わりに PCB 分解微生物が活性化したと考えられる。さらに、脱塩素活性を発揮するためには、最適な低水素分圧条件が整う必要がある(Sokol et al., 1994, Wu et al., 1996, 2000, 2002, Rysavy et al., 2005)。これらの考察から、本培養物中では、*Firmicutes* 門の優占化により供給される水素について、硫酸還元細菌やメタン生成菌が消費すると同時に、PCB 分解微生物も利用することで、そのバランスが成り立っている可能性が推測された。これらの結果から、PS 培養物で獲得された分解活性を BS 培地、GB0.5 培地等へ継代することで、その群集構造に変化が生じ、水素利用効率が変化し、PCB 混合物分解活性が高まったものと考察した(Fig. 5-1)。
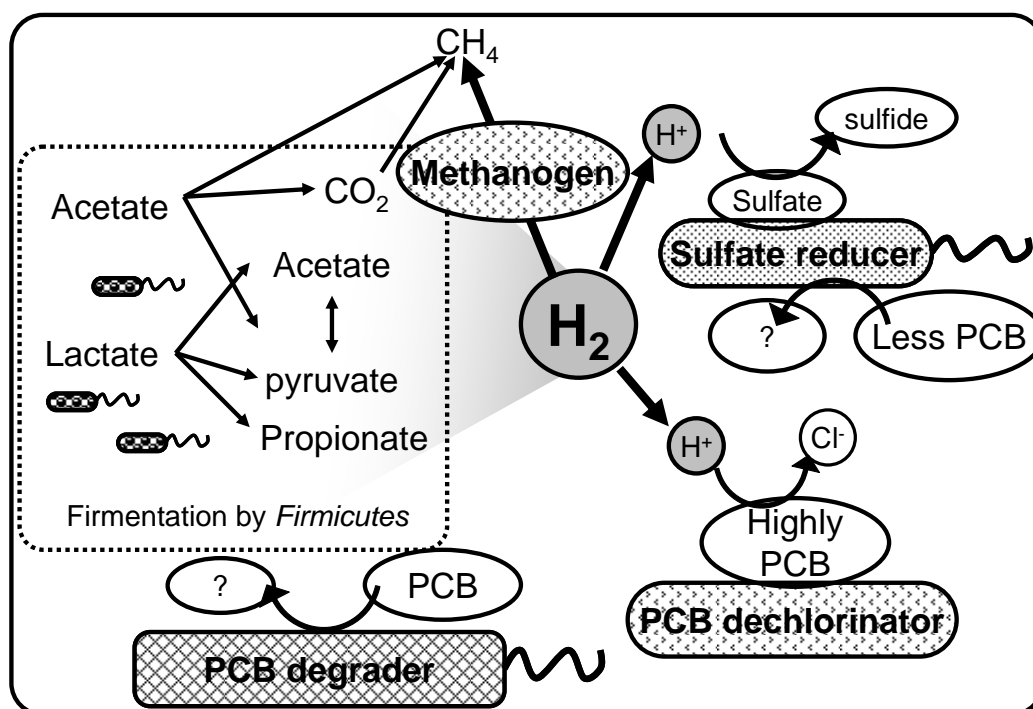
Fig. 5-1 Conceptual illustration of hydrogen utilization in the anaerobic PCB-degrading culture

最後に、本 PCB 混合物分解活性の汚染物絶対量に対する半減期を算出した。水田土壌培養物中における PCB 混合物 500 μg の半減期は、推定値で 400 日程度であった。しかし、継代維持に成功した PS 培養物中では、PCB 混合物 100 μg の半減期は 240 日程度となった。これらの半減期は、堆積物や底質土中で見られた分解活性(Shikkonen and Passivira, 2000)と同程度もしくは早かった。また、第 3 章で獲得した BS 培養物中や、第 4 章で獲得した GB0.5 培養

物中での PCB 混合物 100 µg の半減期は、さらに早く 75 日程度と見積もられた。さらに、GB0.5 培養物において PCB 混合物量が通常条件の 10 倍(1000 µg)の半減期は、高濃度にも関わらず、630 日程度となり最速値を得た。しかも、AL 培地を再添加した GB0.5 培養物では、実際に約 5 ヶ月(140 日)の培養で 100 µg の PCB 混合物を 4 分の 1 量(75 µg)まで分解できることを示した。これらの結果から、本研究で得られた PCB 混合物分解培養物に、培養条件を改変し、適当な栄養源を添加することで、分解対象とする PCB 混合物を完全に除去できる可能性を示すことができた。

5.2 技術的応用と展望

本研究では、現場投与を想定した PCB 汚染浄化微生物バリヤーの開発を最終目標としている。有機物を含まない材料である BS や GB を用いることで、PCB 混合物分解率も向上したことから、PCB 分解活性促進因子の一つが、培養物中の PCB の微生物利用率であることが考えられた。実際にバイオバリヤーとして実用化する場合、PCB 混合物の存在環境は現在のバッチ試験とは大きく異なり、環境中に極低濃度で拡散した PCB 混合物を浄化する必要があるために、PCB 吸着能および吸着した PCB の分解活性を把握する必要がある。しかし、有機物を含まない材料で作られた、微生物定着可能な空隙を持った模擬的資材を用いることで、PCB 分解バリヤーのモデル資材も試験した。

PCB 分解微生物バリヤー開発の将来的な可能性として、2 つの可能性が考えられる。一つは、バイオオーギュメンテーション技術を想定した微生物定着型のバイオバリヤーの開発である。これは、幅広い PCB 同族体に対する最高分解活性を有する分解微生物群集を資材化するものである。この技術は、現段階では、その活性維持に栄養源添加が必須であるため、その供給方法等が未考慮であるが、本研究で構築した培養物を直接資材化する最も現実的な方法である。もう一方は、広義のバイオスティミュレーション技術を想定した微生物集積型のバイオバリヤーの開発である。これは、PCB 分解活性の向上と相関のある最適生息空間を創造し、分解活性制御因子(栄養源等)を含む資材を汚染現場に埋設し、現位置の土着微生物を自然集積して、分解・浄化させることを期待している。この技術は、初期施工コストも比較的低く、メンテナンスフリーな浄化技術に近いうえに、外部からの微生物接種と比べ安全性への懸念も低減されるものと期待できる。

一方、PCB 混合物分解バリヤーを開発していく上での重要な検討事項は、以下の 7 点であると考えている。①バリヤー包埋微生物の長期安定維持、②幅広い PCB 同族体に対する安定な分解活性、③PCB 混合物分解微生物の高集積化(高効率)、④PCB 混合物分解活性制御因子の特定、⑤④のメンテナンス方法、⑥PCB 混合物分解活性の安全性(分解産物の特定、病原性微生物種の検査)、⑦実汚染浄化技術能力(複合汚染、対応汚染範囲の検討、シミュレーション)。この 7 点に関して、①②は、現段階でもほぼ達成できた。また、本研究で構築した培養方法および培養条件によって、KC-300/400 のみならず、幅広い PCB 混合物に対する嫌気分

解活性の獲得も期待できる。③は、BS および GB 培地でその現象を把握した段階であり、④は、分解活性促進に酢酸塩添加が必要であることを突き止めたが、現段階では PCB 混合物分解活性に直接関与する微生物種もその必須栄養源も特定できていない点で課題が残っている。⑤以降は、PCB 混合物分解メカニズムの解明には至っていないため、その栄養源供給システムおよび費用効果、運用期間、さらにパブリックアクセプタンスも含め、検討する段階には至っていない。しかし、今後これらの課題を解決していくことによって、嫌気的 PCB 分解バリヤー技術として本研究の成果を応用していくことが、十分可能であることを明らかにできた。

5.3 結論

本学位論文によって、嫌気的 PCB 混合物の微生物分解活性の獲得と、そのバイオバリヤー開発に向けた基礎知見を提供できた。また、本研究で得られた知見や技術を応用することで、実用技術への応用の可能性、及び学術的な新たな視点を提案できたと考えている。

参考文献

Adrian, L.,Manz, W., Szewzyk, U., Görisch H. (1998) Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene, Appl. Enviorn. Microbiol., 64, 496-503.

Adrian L., Szewzyk U., Wecke J., Görisch H. (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. Nature, 408, 580-583.

Ahmed M., Focht D. D. (1973) Oxidation of polychlorinated biphenyls by achromobacter PCB, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 10, 70-72.

Bedard D. L., Bailey J. J., Reiss B. L., Jerzak G. V. S. (2006) Development and characterization of stable sediment-free anaerobic bacterial enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260., Appl. Environ. Microbiol., 72, 2460-2470.

Bedard D. L., Dort H. V., Deweerd K. A., (1998) Brominated biphenyls prime extensive microbial reductive dehalogenation of Aroclor 1260 in Housatonic river sediment., Appl. Environ. Microbiol., 64, 1786-1795.

Bedard D. L., Quensen J. F. III (1995) Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls, In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals (Young L Y and Cerniglia, Eds)., Wiey-Liss Division, John Wiley and Sons, New York, 127-216.

Berkaw M., Sowers K. R., May H. D. (1996) Anaerobic *ortho* dechlorination of polychlorinated biphenyls by estuarine sediments from Baltimore Harbor., Appl. Environ. Microbiol., 62, 2534-2539.

Becker J. G., Berardesco G., Rittmann B. E., Stahl D. A. (2005) The role of syntrophic associations in sustaining anaerobic mineralization of chlorinated organic compounds., Environ. Health Perspectives, 113, 310-316.

Borja J., Taleon D. M., Auresenia J., Gallardo S. (2005) Polychlotinated biphenyls and their biodegradation., Process Biochem., 40, 1999-2013.

Bouchard B., Beaudet R., Villemur R., McSween G., Lépine F., Bisaillon J. G. (1996) Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol., Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 1010-1015.

Boyle A. W., Balke C. K., Prince W. A. II, May H. D. (1993) Effects of polychlorinated biphenyl congener concentration and sediment supplementation on rates of methanogenesis and 2,3,6-trichlorobiphenyl dechlorination in anaerobic enrichment., Appl. Environ. Microbiol., 59, 3027-3031.

Brown J. F., Bedard D. L., Brennnan M. J., Carnahan J. C., Feng H., Wager R. E. (1987) Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments., Science, 236, 709-712.

Casamayor E. O., Massana R., Benlloch S., Øvreås L., Díez B., Goddard V. J., Gasol J. M., Joint I., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern., Environ. Microbiol., 4, 338-348.

Chang B. V., Liu W. G. (2001) Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment., Chemosphere, 45, 849-856.

Choi S. D., Hong H. B., Chang Y. S. (2003) Adsorption of halogenated aromatic pollutants by a protein released from *Bacillus pumilus*., Water Res., 33, 4004-4010.

Cutter L., Sowers K. S., May H. D. (1998) Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment., Appl. Environ. Microbiol., 64, 2966-2969.

Cutter L. A., Watts J. E. M., Sowers K. R., May H. D. (2001) Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,4,5-chlorobiphenyl., Environ. Microbiol., 3: 699-709.

Fagervold S. K., Watts J. E. M., May H. D., Sowers K. R. (2006) Sequential reductive dechlorination of *meta*-chlorinated polychlorinated biphenyl congeners in sediment microcosms by two different *Chloroflexi* phylotypes., Appl. Environ. Microbiol., 71, 8085-8090.

Fantroussi S. E., Naveau H. Afathos S. N. (1998) Anaerobic dechlorinating bacteria, Biotechnol. Prog., 14, 167-188.

Fava F., Gentilucci S., Zanaroli G. (2003) Anaerobic biodegradation of weathered polychlorinated biphenyls (PCBs) in contaminated sediments of Porto Margera (Venice Lagoon, Italy), Chemosphere, 53, 101-109.

Fava F., Gioia D., Marchetti L., Quattroni G. (1996) Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed batch bioreactors, Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 562-568.

Fava F., Zanaroli G., Young L. Y. (2003) Microbial reductive dechlorination of pre-existing PCBs and spiked 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyls in anaerobic slurries of a contaminated sediment of Venice lagoon (Italy). FEMS Microbiol. Ecol., 44, 309-318.

Fennell D. E., Nijenhuis I., Wilson S. F., Zinder S. H., Häggblom M. M. (2004) *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants., Environ. Sci. Technol., 38, 2075-2081.

Garbarini D. R., Lion L. W. (1986) Influence of the nature of soil organics on the sorption of tolene and trichloroethylene., Environ. Sci. Technol., 20, 1263-1269.

Gunsalus R. P., Romesser J. A., Wolfe R. S. (1978) Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the metyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautorophicum*., Biochem., 17, 2374-2377.

Hartkamp-commandeur L. C. M., Gerritse J., Govers H. A. J., Parsons J. R. (1996) Reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms enriched from duch sediments, Chemosphere, 32, 1275-1286.

Holliger C., Hahn D., Harmsen H., Ludwig W., Schumacher W., Tindall B., Vazquez F., Weiss N., Zhender A. J. B. (1998) *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration, Arch. Microbiol., 169, 313-321.

Holloman T. R. P., Elberson M. A., Cutter L. A., May H. D., Sowers K. R. (1998): Characterization of a defined 2,3,4,5-tetrachlorobiphenyls-*ortho*-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA., Appl. Environ. Microbiol., 64, 3359-3367.

Katayama A., Fujie K. (2000) Characterization of soil microbiota with quinone profile., Soil biochem., 10, 303-347.

Kim J., Rhee G. Y. (1997) Population dynamics of polychlorinated biphenyl-dechlorinating microorganisms in contaminated sediments, Appl. Environ. Microbiol., 63, 1771-1776.

Kim K. S., Hirai Y., Kato M., Urano K., Masunaga S. (2004) Detailed PCB congener patterns in incinerator flue gas and commercial PCB formulations (Kanechlor)., Chemosphere, 55, 539-553.

Krasotkina J., Walters T., Maruya K. A., Ragsdale S. W. (2001) Characterization of the B_{12}- and iron-sulfur-containinc reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*, J. Biol. Chem., 276, 40991-40997.

Lee W., Batchelor B. (2004) Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by soil, Chemsphere, 55, 705-713.

Löffer F. E., Ritalahti K. M., Tiedje J. M. (1997) Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of methanogens, Appl. Environ. Microbil. 65, 4982-4985

Magnuson J. K., Romine M. F., Burris D. R., Kingsley M. T. (2000) Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range, Appl. Environ. Microbiol., 66, 5141-5147.

Maymó-Gatell X., Chien Y. T., Gossett J. M., Zinder S. H. (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethane., Science, 276, 1568-1571.

Meckenstock R. U., Annweiler E., Michaelis W., Richnow H. H., Schink B. (2000) Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture, Appl. Environ. Microbiol. 66, 2743-2747.

Mohn W. W., Kennedy K. (1992) Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1., Appl. Enviorn. Microbiol., 58, 1367-1370.

Mohn W. W., Tiedje J. M. (1990) Catabolic thiosulfate disproportion-action amd carbon dioxide reduction in strain DCB-1, a reductively dechlorinating anaerobe, J. Bacteriol. 172, 2065-2070

Mohn W. W., Tiedje J. M. (1991) Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*, Arc. Microbiol., 157, 1-6

Mohn W. W., Tiedje J. M. (1992) Microbial reductive dehalogenation., Microbiol. Rev. 56, 482-507.

Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA., Appl. Environ. Microbiol., 59, 695-700.

Natarjan M. R., Wu W. M., Nye L. W., Wang H., Bhatanager L., Jain M. K. (1996) Dechlorination of polychlorinated biphenyl congeners by an anaerobic microbial consortium., Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 673-677.

Natarjan M. R., Wu W. M., Wang H., Bhatnagar L., Jain M. K. (1998) Dechlorination of spiked PCBs in lake sediment by anaerobic microbial granules., Water Res., 32, 3013-3020.

Natarajan M. R., Wu W. M., Sanford R., Jain M. K. (1999) Degradation of biphenyl by methanogenic microbial consortium, Biotechnol. Let., 21, 741-745.

Natarajan M. R., Wang H. R. (1995) Effect of oxygen and strange condition on the metabolic activities of polychlorinated biphenyls dechlorinationg microbial granules, Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 733-738.

Nath K., Das D. (2004) Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches., Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 520-529.

Neumann A., Wohlfarth G., Diekert G. (1998) Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. ,180, 4140-4145.

Nonaka H., Keresztes G., Shinoda Y., Ikenega Y., Abe M., Naito K., Inatomi K., Furukawa K., Inui M., Yukawa H. (2006) Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafinense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195, J. Bavteriol. 188, 2262-2274.

Palekar L. D., Maruya K. A., Kostka J. E., Wiegel J. (2003) Dehalogenation of 2.6-dibromobiphenyl and 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyls in contaminated estuarine sediment, Chemosphere, 53, 593-600.

Roser D. J. (1980) Ethidium bromide: a general purpose fluorescent stain for nucleic acid in bacteria and eukaryotes and its use in microbial ecology studies, Soil Biol. Biochem., 12, 329-336

Rysavy J. P., Yan T., Novak P. J. (2005) Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source, Water Res., 39, 569-578.

Quensen J. F. III, Boyd S. A., Tiedje J. M. (1990) Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Alochlors) by anaerobic microorganisms from sediments, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2360-2369.

Sekiguchi Y., Kamagata, Y. Nakamura K., Ohashi A., Harada H. (1999) Fluorescenece in situ

hybridization using 16S rRNA-trageted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules, Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 1280-1288.

Shibata A., Inoue Y., Katayama A. (2006) Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils, Sci. of Total Environ., 367, 979-987.

Sinkkonen S., Paasivirta J. (2000) Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling, Chemosphere, 40, 943-949.

Smits T. H. M., Devenoges C., Szynalski K., Maillard J., Holliger C. (2004) Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities, J. Microbiol. Methods, 57, 369-378.

Sokol R. C., Methoney C. M., Rhee G. Y. (1994) Effect of PCB concentration on reductive dechlorination and dechlorination potential in natural sediments., Water Res., 29, 45-48.

Someya T. (1995) Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a conforal laser scanning microscope, Soil. Microorg. 46, 61-69.

Takasuga T., Kumar K. S., Noma Y., Sakai S. (2005) Chemical characterization of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in technical Kanechlor PCB formations in Japan, Arch. Environ. Contam. Tocicol., 49, 385-395.

Taylor B., Oremland R. S. (1979) Depletion of adenosine triphospate in *Desulfovibrio* by oxyanions of group VI elements, Current. Microbiol., 3, 101-103.

Tiedje J. M., Quensen J. F. III, Sanford J. C., Schimel J. P., Boyd S. A. (1993) Microbial reductive dechlorination of PCBs, Biodegradation, 4, 231 – 240.

Utkin I., Dalton D. D., Wiegel J. (1995) Specifity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1, Appl. Enviorn. Microbiol., 61, 346-351.

Van de Pas B. A., Smidt H. Hagen W. R., vander Oost J., Schraa G., Stams A. J., de Vos W. M. (1999) Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol-reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*, J. Biol. Chem., 274, 20287-20292.

Voice T. C., Weber W. J. (1983) Sorption of hydrophobic compounds by sediments, soils and suspended solids-I, Water Res.,10, 1433-1441.

Watts J. E. M., Fagervold S., May H. D., Sowers K. R. (2005) A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the *Chloroflexi* associated with the reductive dehalogeneation of polychlorinated biphenyls, Microbiology, 151, 2039-2046.

Wiegel J., Wu Q. (2000) Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls, FEMS Micro. Ecol., 32, 1-15.

Wiegel J., Zhang X., Wu Q. (1999) Anaerobic dehalogenation of hydroxylated polychlorinated

biphenyls by *Desulfitobacterium dehalogenans*, Appl. Environ. Microbil. 65, 2217-2221.

Wu Q., Watts J. E. M., Sowers K. R., May H. D. (2002) Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines, Appl. Envrion. Microbiol., 68, 807-812.

Wu Q., Bedard D. L., Wiegel J. (1997) Temperature determines the pattern of anaerobic microbial dechlorination of Arochlor 1260 primed by 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in Woods Pond sediment, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4818-4825.

Wu Q., Milliken C. E., Meier G. P., Watts E. M., Sowers K. R., May H. D. (2002) Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorinating microorganism, Environ. Sci. Technol., 36, 3290-3294.

Wu Q., Sowers K. R., May H. D. (1998) Microbial reductive dechlorination of Aroclor 1260 in anaerobic slurries of esturine sediments, Appl. Microbiol. Environ., 64, 1052-1058.

Wu Q., Sowers K. R., May H. D. (2000) Establishment of polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for double flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium, Appl. Environ. Microbiol., 66, 49-53.

Yan T., LaPara T. M., Novak P. J. (2006) The effect of varying levels of sodium bicarbonate on polychlorinated biphenyl dechlorination in Hudson River sediment cultures, Environ. Microbiol., 8, 1288-1298.

Ye D. Quensen J. F. III, Tiedje J M, Boyd S. A. (1995) Evidence for *para* dechlorination of polychlorobiphenyls by methanogenic bacteria, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2166-2171.

Ye, D., Quensen J. F. III, Tiedje J. M., Boyd S. A. (1999) 2-Bromoethanesulfate, sulfate, molybate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasterised microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., 65, 327-329.

Yoshida N., Takahashi N., Hiraishi A. (2005) Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin- dechlorinating microbial community by use of microcosm studies, Appl. Environ. Microbiol., 71, 4325-4334.

Yoshida N., Yoshida Y., Handa Y., Kim H. K., Ichihara S., Katayama A. (submitted) Polyphasic characterization of an anaerobic microbial community completely dechlorinating pentachlorophenol to phenol enriched from paddy soil.

Zhang X., Young L. Y. (1997) Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia, Appl. Enviorn. Microbiol., 63, 4759-4764.

Zheng D., Angenent L. T., Raskin L. (2006) Monitoring granule formation in anaerobic upflow bioreactors using oligonucleotide hybridization probes, Biotechnol. Bioeng., 94, 458-472.

Zwiernik M. J., Quensen III, J. F., Boyd S. A. (1998) $FeSO_4$ amendments stimulate extensive anaerobic PCB dechlorination, Environ. Sci. Technol., 32, 3360-3365.

JESCO (2006) http://www.jesconet.co.jp/
MERL team (2002) Metals for Environmental Remediation and Learning (CD-R)
WHO (2006) Project for the re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors (TEFs) of dioxins and dioxin-like compounds The International program on Chemical Safety
環境省 (2005) 平成 14 年度環境省 POPs モニタリング調査結果
環境省 (2001) ポリ塩化ビフェニル廃棄物処理基本計画書
環境省 (2005) 環境省平成 14 年度 POPs モニタリング調査結果
環境省 (2006) 平成 18 年度環境白書
産業廃棄物処理事業振興財団 (1999) 廃棄物処理法新処理基準に基づくＰＣＢ処理技術ガイドブック
大森 俊雄ら (2000) 環境微生物学 昭晃堂 東京
片山 新太 (2000) 6.土壌微生物による農薬分解ー生物有効性と微生物活性 ，日本土壌肥料学会編, 植物と微生物による環境修復 126-153 博友社 東京
片山 新太ら (2006) 環境省 2006 年成果報告書
馬場 大輔 (2004) 修士論文
清水 あゆみ (2006) 修士論文

謝辞

本学位論文を作成するにあたり、博士課程前後期 5 年間を通して、多大なるご指導、ご支援をいただいた名古屋大学エコトピア科学研究所 片山 新太教授に深く感謝いたします。また、研究を進めるにあたりサポートしてくださった同 工学研究科 井上 康助手、研究の方向性・実験手法・学術的知見等に関して多大なるご教授をいただいた同 エコトピア科学研究所 吉田 奈央子研究員、そして片山研究室の学生のみなさんに感謝の意を示します。

また、本学位論文の審議にあたり、中間審査よりご指導くださった同 環境学研究科 井村 秀文教授、生命農学研究科 小林 哲夫教授、工学研究科 辻本 哲郎教授(五十音順)に深く感謝いたします。

本 PCB 混合物分解活性の微生物接種源とした水田土壌をご提供くださった愛知県農業技術センターのみなさん、基礎研究を構築してくださった安田 剛氏、難航する本研究を 3 年にわたって共に進めた木村 優子氏にも御礼申し上げます。

最後に、5 年にも渡る研究生活を理解し、あらゆる面で全面的にサポートしてくれた家族、そして、色んな場面で叱咤激励し、常に温かく見守ってくれた友人たちに深く感謝します。